

WILTON SOARES CARDOSO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES DE
FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA EM FERMENTAÇÃO NO
ESTADO SÓLIDO E SACARIFICAÇÃO DA PALHA DE SORGO
VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica
Agrícola, para obtenção do título
de *Doctor Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C286o
2012

Cardoso, Wilton Soares, 1979-

Obtenção e caracterização de celulasas de fungos da
podridão branca em fermentação no estado sólido e
sacarificação da palha de sorgo visando a produção de
etanol / Wilton Soares Cardoso. – Viçosa, MG, 2012.
xiv, 111f. ; 29cm.

Orientador: José Humberto de Queiroz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 101-111

1. Biocombustível. 2. Celulose. 3. Enzimas. 4. Sorgo.
5. Palha. 6. *Phanerochaete chrysosporium*.
7. *Pycnoporus sanguineus*. 8. *Trametes versicolor*.
9. *Pleurotus eryngii*. 10. *Pleurotus ostreatus*. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 662.88

WILTON SOARES CARDOSO

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES DE FUNGOS DA PODRIDÃO
BRANCA EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO E SACARIFICAÇÃO DA
PALHA DE SORGO VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para obtenção do título
de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2012.

Maria Catarina Megumi Kasuya
(Coorientadora)

Flávio Dessaune Tardin
(Coorientador)

Maurício Xavier Coutrim

Sérgio Antonio Fernandes

José Humberto de Queiroz
(Orientador)

A minha esposa Flávia e a minha filha Sofia,

Dedico e ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Sofia Pinheiro Cardoso, simplesmente, por existir.

A Flávia, pelo amor, pela companhia e segurança para conquistar meus objetivos.

Aos meus pais, José Cardoso (*in memoriam*) e Maria Rivalda, pelo apoio, pelas orações e pela abdicação.

Aos meus irmãos Wellington, Wlidenes e Filipe, pelo incentivo e pela confiança.

A minha outra família, José Cleves, Alzira e Leonardo pelo incentivo, orações e pela confiança.

Ao Prof. José Humberto pelos valiosos ensinamentos, pela orientação, amizade e confiança.

À Prof^a Catarina Kasuya pela oportunidade de trabalhar com os fungos da coleção do laboratório de microbiologia, disponibilidade e pelos conselhos sempre pertinentes.

Ao amigo Dr. Flávio Tardin pela disponibilidade, incentivo e confiança.

Aos Professores Maurício Xavier Coutrim e Sérgio Antonio Fernandes, pela disponibilidade de participarem da banca examinadora e pelas importantes considerações.

A todos os estagiários e bolsistas, Gabriella, Paula Queiroz, Samuel, Paula, Raíssa, Cecília que contribuíram com os trabalhos dessa tese.

Aos colegas conquistados antes e durante o doutorado, Emanuel, Fernando, Fabiano, Hugo, Eduardo, Larissa, Bruna, Renata, Isabela, Filipe, Cidinha pela convivência.

À Universidade Federal de Viçosa e ao departamento de Bioquímica Agrícola pela oportunidade de realizar o curso.

A FAPEMIG e ao CNPq por contribuírem financeiramente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE SIGLAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS GERAIS.....	11
3 - CAPÍTULO I. UTILIZAÇÃO DA PALHA DE SORGO FORRAGEIRO (<i>Sorghum bicolor</i>) PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO: PRÉ-TRATAMENTOS E HIDROLISE ENZIMÁTICA.....	12
3.1 - INTRODUÇÃO.....	13
3.2 - OBJETIVOS.....	18
3.3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.3.1 - Material ligninocelulósico.....	19
3.3.2 - Pré-tratamentos.....	19
3.3.3 - Métodos analíticos.....	21
3.3.4 - Ensaio enzimático.....	25
3.3.5 - Sacarificação enzimática.....	26
3.3.6 - Análises estatísticas.....	27
3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
3.4.1 - Caracterização ligninocelulósica da palha de sorgo.....	28
3.4.2 - Pré-tratamentos.....	28
3.4.3 - Morfologia da biomassa de sorgo in natura e pré-tratada por microscopia de varredura.....	30

3.4.4 - Sacarificação.....	33
3.5 - CONCLUSÃO.....	37
4 - CAPÍTULO II. PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS DE FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA, POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	38
4.1 - INTRODUÇÃO.....	39
4.2 - OBJETIVOS.....	42
4.3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.3.1 - Produção do complexo de celulasas por fermentação no estado sólido.....	43
4.3.2 - Obtenção do extrato enzimático.....	44
4.3.3 - Ensaio enzimáticos.....	44
4.3.4 - Caracterização das atividades do complexo de enzimas.....	47
4.3.5 - Sacarificação enzimática.....	48
4.3.6 - Pré-tratamentos da palha de sorgo.....	50
4.3.7 - Análises estatísticas.....	51
4.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.4.1 - Produção do complexo de celulasas por fermentação no estado sólido.....	52
4.4.2 - Ensaio enzimáticos.....	53
4.4.3 - Caracterização das atividades celulolíticas dos extratos dos fungos da podridão branca em palha de sorgo.....	58
4.4.3.1 - Celulase total (FPase).....	58
4.4.3.2 - Endoglucanase (CMCase).....	62
4.4.3.3 - Exoglucanase (AVICELase).....	66
4.4.3.4 - β -glicosidases.....	68
4.4.4 - Sacarificação enzimática.....	71
4.5 - CONCLUSÃO.....	77

5 - CAPÍTULO III. COQUETEL MÍNIMO DE ENZIMAS PARA ATIVIDADES CELULOSE TOTAL DOS EXTRATOS OBTIDOS DE FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA, POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	78
5.1 - INTRODUÇÃO GERAL.....	79
5.2 - OBJETIVOS.....	81
5.3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	82
5.3.1 - Produção das celulases por fermentação em estado sólido.....	82
5.3.2 - Extração dos complexos enzimáticos.....	83
5.3.3 - Ensaaios enzimáticos.....	83
5.3.4 - Delineamento Experimental.....	83
5.3.5 - Análises estatísticas.....	85
5.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
5.4.1 - Produção de celulases por fermentação em estado sólido.....	86
5.4.2 - Otimização das atividades celulases total.....	86
5.5 - CONCLUSÃO.....	98
6 - CONCLUSÕES FINAIS E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	99
7 - REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

LISTA DE SIGLAS

2G - Etanol de segunda geração ou etanol celulósico

FES - Fermentação em estado sólido

SSF - Solid state fermentation (Fermentação em estado sólido)

Fsm. - Fermentação submersa

DCCR – Delineamento do composto central rotacional

U - Atividade enzimática

U/g - Atividade enzimática por grama de material fonte de carbono

FDA - Fibra detergente ácido

FDN - Fibra detergente neutro

LAP - Laboratory Analytical Procedure.

DNS - Ácido 3,5-dinitrossalicílico

ANOVA - Análise de variância

CMC - Carboximetil celulose

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 3.1 - Características agronômicas de culturas promissoras para produção de biomassa	15
Tabela 3.2 - Condições utilizadas nos pré-tratamentos da palha do sorgo forrageiro BRS 655	20
Tabela 3.3 - Procedimento para obtenção da curva padrão de açúcares redutores	24
Tabela 3.4 - Composição ligninocelulósica da palha de sorgo	28
Tabela 3.5 – Composição ligninocelulósica da palha de sorgo BRS 655 <i>in natura</i> e das polpas obtidas após os pré-tratamentos	29
Tabela 4.1 - Procedimento para obtenção da curva padrão de proteínas utilizando-se como padrão BSA	46
Tabela 4.2 - Condições dos extratos utilizadas na hidrólise da palha de sorgo forrageiro	48
Tabela 4.3 - Carga de enzimas calculada pela atividade de Celulase total (FPU) por grama de celulose e por grama de biomassa	49
Tabela 4.4 - Condições utilizadas nos pré-tratamentos da palha de sorgo	50
Tabela 4.5 - Atividades enzimáticas dos complexos de enzimas U/g de palha de sorgo (massa seca), produzidos pelos fungos da podridão branca por fermentação em estado sólido, após 20 dias, com umidade de 50% e incubado a 28 °C	53
Tabela 4.6 - Teor de proteína extracelular obtido em FES de fungos da podridão branca cultivados na palha de sorgo	57
Tabela 5.1 - Fatores e níveis dos fatores da matriz DCCR ($2^5 + 8$ pontos centrais + 10 axiais)	84
Tabela 5.2 - Matriz DCCR para a otimização da atividade enzimática FPAse em diferentes níveis de extratos brutos obtidos de fungos da podridão branca	84
Tabela 5.3 - Atividades enzimáticas U.L ⁻¹ de extrato do complexo de enzimas dos fungos da podridão branca, obtido por fermentação em estado sólido da palha do sorgo	86
Tabela 5.4 - Matriz DCCR com os resultados das atividades enzimáticas FPAse U.L ⁻¹ de extrato de enzimas dos fungos da podridão branca	87

Tabela 5.5 - ANOVA para superfície de resposta do modelo quadrático da otimização das atividades enzimáticas de coquetéis dos extratos de fungos da podridão branca	88
Tabela 5.6 - Níveis dos fatores para o máximo da atividade de Celulose total	91

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 - Culturas energéticas, potenciais matérias-primas para o bietanol.	4
Figura 1.2 - Alteração estrutural do material ligninocelulósico com o pré-tratamento.	6
Figura 1.3 - Sinergia das enzimas envolvidas na hidrólise da celulose.	8
Figura 3.1 - Esquema da utilização da biomassa para a produção de etanol.	14
Figura 3.2 - Palha do sorgo forrageiro BRS 655.	18
Figura 3.3 - Fotomicrografias eletrônicas de varredura da palha de sorgo <i>in natuta</i> e pré-tratada.	32
Figura 3.4 - Imagem dos materiais utilizados na sacarificação enzimática.	34
Figura 3.5 - Sacarificação do sorgo forrageiro não tratado e das polpas obtida do sorgo após aplicação de pré-tratamentos.	35
Figura 4.1 - Estrutura e composição básica da biomassa vegetal.	39
Figura 4.2 - Fermentação em estado sólido da base de palha de sorgo forrageiro por fungos da podridão branca.	52
Figura 4.3 - Atividades das enzimas FPase, CMCase e AVICELase (U/g de massa seca) dos fungos de podridão branca.	53
Figura 4.4 - Efeito do pH sobre as atividades aparente de Celulase total (FPase) dos fungos.	59
Figura 4.5 - Efeito da temperatura sobre as atividades aparente de Celulase total (FPase) dos fungos.	60
Figura 4.6 - Termoestabilidades das atividades Celulase total (FPase) dos fungos.	61
Figura 4.7 - Efeito do pH nas atividades das endoglucanases (CMCase) dos fungos.	62
Figura 4.8 - Efeito da temperatura nas atividades das endoglucanases (CMCase) dos fungos.	64
Figura 4.9 - Termoestabilidade das atividades das endoglucanases (CMCase) dos fungos.	65

Figura 4.10 - Efeito do pH nas atividades das exoglucanases (AVICELase) dos fungos.	67
Figura 4.11 - Efeito da temperatura nas atividades das exoglucanases (AVICELase) dos fungos.	67
Figura 4.12 - Termoeestabilidade das atividades das exoglucanases (AVICELase) dos fungos.	68
Figura 4.13 - Efeito do pH nas atividades das β -glicosidases dos fungos.	69
Figura 4.14 - Efeito da temperatura nas atividades das β -glicosidases dos fungos.	70
Figura 4.15 - Termoeestabilidade das atividades das β -glicosidases dos fungos.	71
Figura 4.16 - Imagem dos materiais utilizados na sacarificação enzimática.	72
Figura 4.17 - Resultado em relação ao percentual de biomassa, da sacarificação da palha de sorgo forrageiro <i>in natura</i> e das polpas obtidas de pré-tratamento, pelos complexos multi-enzimas dos fungos, <i>Phanerochaete chrysosporium</i> PC , <i>Pycnoporus sanguineus</i> PYC02 , <i>Trametes versicolor</i> TRAM01 , <i>Pleurotus eryngii</i> PLE04 e <i>Pleurotus ostreatus</i> PLO06 , produzidos por FES.	73
Figura 4.18 - Resultado em relação ao percentual de celulose, da sacarificação da polpa obtida da palha de sorgo forrageiro pré-tratada por ácido e deslignificação, pelos complexos multi-enzimas dos fungos, <i>P. chrysosporium</i> PC , <i>P. sanguineus</i> PYC02 , <i>T. versicolor</i> TRAM01 , <i>P. eryngii</i> PLE04 e <i>P. ostreatus</i> PLO06 , produzidos por FES e uma enzima comercial (Multifect GC).	75
Figura 5.1 - Gráfico das variações dos níveis de um único fator e atividade FPAse.	90
Figura 5.2 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total nas variações na quantidade (μ L) de extratos dos fungos PLO06 e PYC02.	91
Figura 5.3 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total nas variações na quantidade (μ L) de extratos dos fungos PLO06 e TRAM01. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PYC 100,00 μ L, PC 200,00 μ L e PLE04 200,00 μ L.	92
Figura 5.4 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total nas variações na quantidade (μ L) de extratos dos fungos PC e PYC02. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: TRAM 200,00 μ L, PC 100,00 μ L e PLO06 200,00 μ L.	92

Figura 5.5 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total nas variações na quantidade (μL) de extratos dos fungos PC e PLE04. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PYC 100,00 μL, TRAM 200,00 μL e PLO06 100,00 μL.	93
Figura 5.6 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total nas variações na quantidade (μL) de extratos dos fungos TRAM01 e PYC02. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PC 200,00 μL, PLE04 200,00 μL e PLO06 100,00 μL.	93
Figura 5.7 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total nas variações na quantidade (μL) de extratos dos fungos PYC02 e PLE04. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PC 200,00 μL, TRAM01 200,00 μL e PLO06 100,00 μL.	94
Figura 5.8 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total nas variações na quantidade (μL) de extratos dos fungos TRAM01 e PLE04. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PYC 100,00 μL, PC 200,00 μL e PLO06 100,00 μL.	94
Figura 5.9 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total nas variações na quantidade (μL) de extratos dos fungos PC e TRAM01. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PYC 100,00 μL, PLE04 200,00 μL e PLO06 100,00 μL.	95
Figura 5.10 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total nas variações na quantidade (μL) de extratos dos fungos PLO06 e PLE04. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PYC 100,00 μL, PC 200,00 μL e TRAM01 200,00 μL.	95
Figura 5.11 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total nas variações na quantidade (μL) de extratos dos fungos PLO06 e PC. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PYC 100,00 μL, TRAM 200,00 μL e PLE04 200,00 μL.	96

RESUMO

CARDOSO, Wilton Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Obtenção e caracterização de celulasas de fungos da podridão branca em fermentação no estado sólido e sacarificação da palha de sorgo visando a produção de etanol.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Coorientadores: Maria Catarina Megumi Kasuya, Sebastião Tavares de Rezende e Flávio Dessaune Tardin.

Buscando alternativas tecnológicas para o etanol, este trabalho estudou a produção de celulasas por fermentação em estado sólido (FES), utilizando a palha do sorgo como substrato e cinco linhagens de fungos da podridão branca, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus eryngii* e *P. ostreatus*. Avaliou-se também a palha do sorgo, quanto ao seu potencial diante dos pré-tratamentos e hidrólise enzimática para a produção de etanol celulósico. Dos pré-tratamentos avaliados, ácido, básico e ácido seguido por deslignificação, o pré-tratamento básico da palha do sorgo BRS 655 foi suficiente para proporcionar uma alta digestibilidade enzimática, alcançando 85% de hidrólise por uma enzima comercial. A palha de sorgo utilizada se mostrou um substrato adequado para a produção de celulasas em FES por fungos da podridão branca. Dentre as enzimas estudadas, destacou-se a β -glicosidase termoestável do *P. sanguineus*. Na sacarificação da palha e polpas pré-tratadas, o complexo (extrato) multi celulasas do *P. chrysosporium* hidrolisou 50% da polpa básica, após 72 h. e com carga de 8 FPU.g⁻¹ de biomassa. Em condições semelhantes, uma enzima comercial alcançou apenas 3% de hidrólise. Nos coquetéis dos extratos, a atividade de FPAse aumentou significativamente para todos os coquetéis dos cinco fungos, em comparação com os extratos individuais de cada fungo. O coquetel mínimo para a máxima atividade de FPAse foi de 100 μ L de extratos de cada um dos fungos, *P. sanguineus*, *P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, *P. eryngii*, e 200 μ L do *T. versicolor*.

ABSTRACT

CARDOSO, Wilton Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Obtaining and characterization of cellulases of white rot fungi in the solid state fermentation and saccharification straw of sorghum aiming to the production of ethanol.** Adviser: José Humberto de Queiroz. Co-Advisers: Maria Catarina Megumi Kasuya, Sebastião Tavares de Rezende and Flávio Dessaune Tardin.

Seeking technological alternatives to ethanol, this work studied the production of cellulases by solid state fermentation (SSF), using sorghum straw as substrate and five strains of white rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus eryngii* and *P. ostreatus*. Was also evaluated the straw sorghum, about its potential on the pre-treatments and enzymatic hydrolysis for the production of cellulosic. Of pre-treatments, acid, basic and acid followed by delignification, the basic pretreatment of the straw sorghum BRS 655 was sufficient to provide a high enzymatic digestibility, reaching 85% hydrolysis with a commercial enzyme. The straw sorghum utilized proved to be a suitable substrate for cellulase production in SSF by white rot fungi. Among the enzymes studied, the highlight was thermostable β -glucosidase from *P. sanguineus*. In the saccharification of straw and pulps pretreated, the complex (extract) multi cellulases from *P. chrysosporium* hydrolyzed 50% of the basic pulp after 72 h. and load of 8-FPU.g⁻¹ biomass. Under similar conditions a commercial enzyme reached only 3% of hydrolysis. In the cocktails of the extracts, activity FPase significantly increased for all five of cocktails fungi, in comparison with the extracts of individual fungus. The cocktail minimum to maximum activity FPase was 100 μ L of extracts of each of the fungi, *P. sanguineus*, *P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, *P. eryngii*, and 200 μ L of *T. versicolor*.

1 – INTRODUÇÃO GERAL

O etanol é uma alternativa limpa e renovável para substituição dos combustíveis fósseis e, atualmente, a produção comercial de etanol depende em grande parte, da utilização do amido de milho nos EUA e da sacarose da cana-de-açúcar no Brasil. No entanto, essas duas matérias-primas chocam-se com as cadeias de abastecimento alimentar e estão limitadas pela ocupação de terras férteis, bem como por requisitos climáticos. Para o etanol tornar-se uma fonte viável de combustíveis, novas tecnologias devem ser exploradas, como o etanol celulósico ou de segunda geração (2G).

Essas novas tecnologias de produção de etanol são fundamentais principalmente nos países desenvolvidos, em que as matérias-primas hoje utilizadas competem com a produção de alimentos e os custos de produção são ainda altos em comparação com o petróleo ou o etanol da cana. Sua importância decorre, também, do fato de o etanol celulósico ter potencial de “extrair” pelo menos duas vezes mais combustível da mesma área de terra e da disponibilidade da biomassa, uma matéria-prima praticamente sem valor (TECHNOLOGY REVIEW, 2006). Assim, a produção de etanol ligninocelulósico emerge como novo paradigma mundial (BASTOS, 2007).

Dentre as vantagens do etanol 2G estão: - reduzida emissão de CO₂; - possibilidade de utilização de áreas agrícolas marginais para cultivo de florestas, com menor risco de erosão que a agricultura anual; - menor uso de fertilizantes e pesticidas; - utilização de todo o tipo de resíduo celulósico; - não competição por áreas produtoras de alimentos (LYND, *et al.*, 1991)

O gargalo-chave para o uso da biomassa ligninocelulósica, como matéria-prima para de biocombustíveis, é a falta de tecnologia para a conversão eficiente dessa biomassa em combustíveis líquidos. O fator limitante é que simplesmente não há ainda tecnologias de processamento de baixo custo para converter de forma eficiente uma fração significativa da energia contida na biomassa ligninocelulósica em combustíveis líquidos (RAMIREZ, 2010).

Um dos principais problemas que limitam o aproveitamento dos açúcares contidos na biomassa para a produção de etanol diz respeito aos elevados custos

envolvidos na transformação da matéria-prima até açúcares fermentescíveis. Em comparação, o custo por galão do etanol de milho é de \$1,10, enquanto o etanol 2G é de \$2,30, inviável economicamente, sendo que 20% desse valor são custos relativos às enzimas utilizadas na hidrólise da celulose (BASTOS, 2007).

Os açúcares de qualquer material ligninocelulósico encontram-se na forma de polímeros (celulose e hemicelulose) associados entre si e cobertos por uma macromolécula aromática complexa (lignina), formando a microfibrila celulósica. Esta, por sua vez, constitui a parede celular (fibra) vegetal, uma estrutura recalcitrante difícil de ser desestruturada e convertida em monossacarídeos fermentescíveis (SANTOS *et al.*, 2012).

Para a transformação de ligninocelulose em etanol 2G, muitas etapas são necessárias: colheita da biomassa ligninocelulósica; pré-tratamento; hidrólise para se obter açúcares a partir de celulose e hemicelulose presente na biomassa; conversão de açúcares em bioetanol por fermentação e desidratação, a fim de se atingir as especificações técnicas requeridas (RAMIREZ, 2010).

Por outro lado, no campo da pesquisa, busca-se avançar na melhoria do processo produtivo, com o objetivo de reduzir custos. Estas pesquisas focam diversas etapas do processo, desde o melhoramento genético das plantas, com o objetivo de aumentar os teores de celulose, bem como suas propriedades para extração; desenvolvimento e melhoramento de bactérias com maior tolerância ao etanol durante o processo de fermentação; aumento da velocidade de fermentação, otimização de equipamentos, e outras.

Fontes ligninocelulósicas – culturas energéticas

Diferentemente do etanol convencional, o etanol celulósico pode ser obtido com base em materiais da biomassa ligninocelulósica, como resíduos agrícolas, industriais e urbanos, que devido as suas composições ricas em celulose, podem ser transformadas em etanol, e as suas disponibilidades generalizadas podem reduzir os custos (RAMIREZ, 2010).

Estima-se que as atuais fontes de biomassa (resíduos florestais, agrícolas e urbanos) não serão suficientes para a demanda de combustíveis renováveis em várias partes do mundo. Assim, é necessário vislumbrar novas fontes, a partir de

culturas energéticas, primariamente dedicadas à produção de energia, ao contrário de subprodutos como a palha, bagaço ou resíduos florestais. Existem algumas culturas energéticas, como as plantações de eucaliptos para a produção de carvão vegetal no Brasil, mas a procura de biomassa aumenta com as diversas aplicações tecnológicas (biocombustíveis de segunda geração, co-combustão, madeira para carvão granulados ou briquetes) (BRÁS *et al.*, 2006; BOTELHO FILHO, 2008).

As culturas energéticas são definidas como plantas domesticadas que são cultivadas para produção de energia, sendo que duas categorias principais destas culturas têm sido reconhecidas. A primeira geração de culturas energéticas são aqueles que eram anteriormente domesticadas para produção de alimentos, seja o açúcar, ou óleo vegetal, mas agora são cultivadas para geração de biocombustíveis líquidos como o bioetanol e biodiesel. As culturas energéticas de primeira geração mais comuns incluem o milho, soja, cana-de-açúcar e a colza (BRÁS *et al.*, 2006).

Assim, porque as culturas de primeira geração existentes não poderão cumprir a meta de produção de bioenergia sustentável, novas culturas energéticas têm sido exploradas. Para superar os problemas acima mencionados, as novas culturas devem ser cultivadas em terras marginais inadequadas para produção de alimentos. Eles devem ter um alto rendimento em biomassa com relativamente pouca irrigação e fertilização. A entrada de energia envolvendo plantio, colheita, armazenamento e transporte devem ser minimizados. Estas culturas, domesticadas especificamente para produção de energia, são referidas como culturas energéticas de segunda geração (KARP e SHIELD, 2008).

Culturas ligninocelulósicas (Figura 1.1), que fornecem biomassa como matéria-prima para energia elétrica (co-geração) ou para a produção de bioetanol, são um tipo predominante de culturas energéticas de segunda geração. Neste caso "culturas energéticas" (*crop energy*) são geralmente usadas para referir-se a árvores e gramíneas que oferecem maiores benefícios ambientais e de energia em comparação com as culturas alimentares como o milho (LEMUS e PARRISH, 2009).

No âmbito das culturas ligninocelulósicas estão sendo avaliadas algumas plantas pertencentes à família das gramíneas tais como o “miscanthus” (*Miscanthus* sp.), ‘switchgrass’ (*Panicum virgatum* L.) e ‘reedcanarygrass’ (*Phalaris arundinaceae* L.), o cardo (*Cynara cardunculus* L.) e até o cânhamo (*Canabis sativa* L.), se não apresentasse a dificuldade de se confundir com uma planta alucinógena. Estão ainda em estudo espécies arbóreas como o salgueiro (*Salix viminalis* L.), choupo ou álamo (*Populus* sp.) e eucalipto (*Eucalyptus* sp.) (BRÀS *et al.*, 2006; LEMUS e PARRISH, 2009).

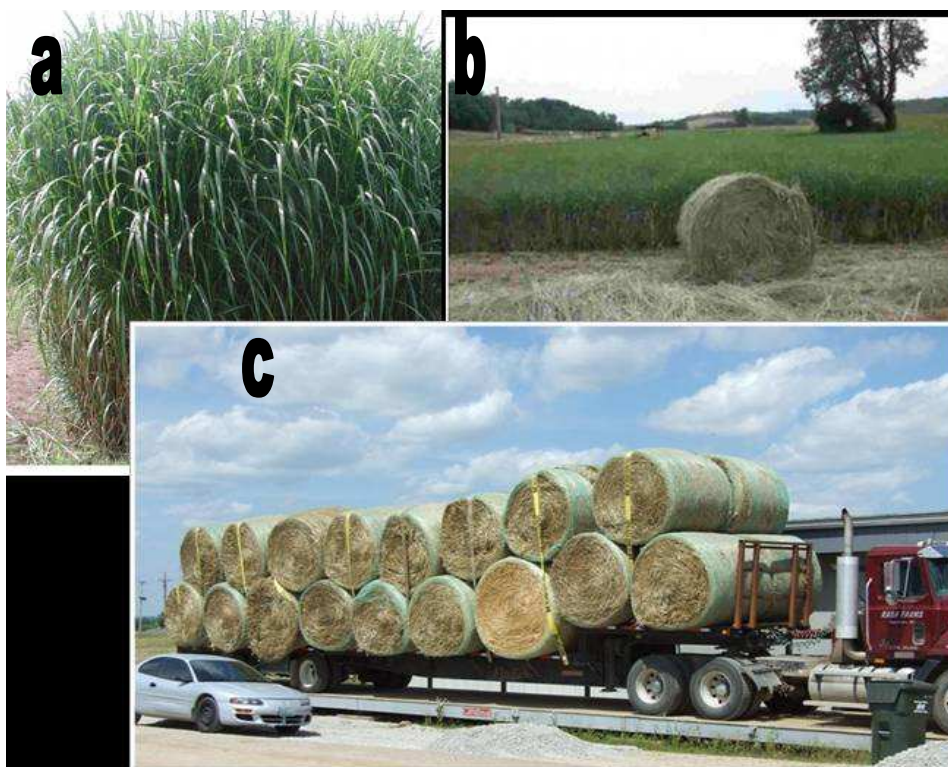


Figura 1.1 - Culturas energéticas, potenciais matérias-primas para o bietanol. **a** – cultura energética “miscanthus” Fonte: <http://www.agri-media.ca/>, **b e c** – ilustração da utilização de biomassa ligninocelulósica como matéria-prima para produção de etanol. Fonte: www.farmenergy.org.

As culturas energéticas lignocelulósicas podem ser divididas em dois tipos: herbáceas e lenhosas. Culturas energéticas herbáceas são principalmente os tipos de gramíneas que são colhidos como o feno. Gramíneas perenes, como a “switchgrass”, “miscanthus” e capim elefante poderiam potencialmente ser

cultivadas como culturas energéticas (BRÁS *et al.*, 2006; LEMUS e PARRISH, 2009).

Produção de etanol 2G

Atualmente parece não haver mais nenhuma dúvida em relação ao enorme potencial de produção de etanol celulósico, estando este submetido a uma corrida tecnológica em diferentes frentes para que em um futuro próximo possa tornar-se o combustível capaz de competir economicamente com a gasolina e com o etanol de cana-de-açúcar, milho e outras matérias-primas, além das suas propriedades significativamente menos agressivas ao meio ambiente (BASTOS, 2007).

As principais dificuldades tecnológicas enfrentadas para implementação comercial do processo de produção de etanol celulósico são (LORA *et al.*, 2008):

- Desenvolvimento de sistemas de pré-tratamento adequados para diferentes tipos de biomassas e processos;
- Desenvolvimento de processos de detoxificação dos produtos da hidrólise;
- Desenvolvimento de enzimas com maior atividade enzimática e baixo custo;
- Integração dos processos de hidrólise e fermentação;
- Desenvolvimento de novas cepas de leveduras capazes de fermentar tanto açúcares C6 como C5;
- Desenvolvimento de esquemas integrados para o aproveitamento dos resíduos de lignina para a geração de eletricidade.

Nesse sentido, um dos principais gargalos que envolvem a produção de etanol celulósico é “desmontar” a parede celular liberando os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis de forma eficiente e economicamente viável.

Devido à estrutura complexa e compacta da biomassa ligninocelulósica, faz-se necessária utilização de pré-tratamentos físicos e, ou químicos antes da sua hidrólise para produção de etanol. O pré-tratamento visa a remoção da lignina e da hemicelulose, a redução da cristalinidade da celulose e o aumento de porosidade, de maneira a tornar a celulose susceptível à hidrólise. Independentemente do processo de hidrólise empregado, seja ácido ou enzimático, uma etapa de pré-tratamento é imprescindível. Existem vários métodos de pré-tratamento: físico (“*steam explosion*”), químico (álcalis, ácidos,

solventes, gases, outros) e biológico (enzima ou fungos) (CARDOSO *et al.*, 2012)

O objetivo do pré-tratamento é alterar as propriedades de resistência, a fim de preparar o material para degradação enzimática, como visualizado na Figura 1.2 (WYMAN, 1996; TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

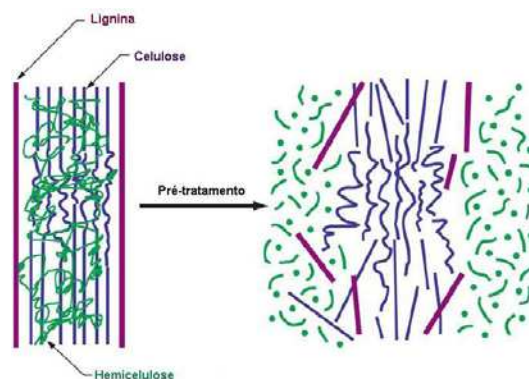


Figura 1.2 – Alteração estrutural do material ligninocelulósico com o pré-tratamento. Fonte: US Department of Energy Genome Programs <<http://genomics.energy.gov>>).

Dentre os diversos pré-tratamentos aplicados à biomassa, os mais utilizados são os pré-tratamentos básico e ácido.

Processos alcalinos de pré-tratamento utilizam condições moderadas de operação (temperatura e pressão), em comparação com os sistemas ácidos. O principal efeito consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior reatividade da fibra. O pré-tratamento alcalino é mais eficaz nos resíduos de materiais agrícolas do que em madeira (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

O álcali, geralmente soda ou cal, tende a causar um “inchamento” da biomassa, de modo que a cristalinidade da celulose decresce, enquanto ocorre um incremento da superfície específica e da porosidade da mesma e tornando os materiais acessíveis às enzimas hidrolíticas (KASSIM e EL-SHAHED *et al.*, 1986; ZHENG *et al.*, 2009).

O pré-tratamento ácido diluído é provavelmente o método mais comumente aplicado entre os pré-tratamentos químicos. Pode ser usado tanto como um pré-tratamento de ligninocelulose para hidrólise enzimática, ou como método de hidrólise de açúcares fermentáveis (TAHERZADEH e KARIMI, 2008). O

processo de hidrólise com ácido consiste em aquecer uma solução de ácido e biomassa no reator. São utilizadas temperaturas que variam de 140-200 °C, onde cerca de 80-90% das hemiceluloses são recuperadas majoritariamente na forma de monômeros e 30-50% de lignina é passível de extração (CARDOSO *et al.*, 2012).

O pré-tratamento ácido pode operar tanto sob temperatura alta (> 160 °C) e baixa concentração de ácido (pré-tratamento ácido diluído), ou sob temperatura baixa (< 160 °C) e alta concentração de ácido. A temperatura de funcionamento inferior em pré-concentração de ácido (por exemplo, 40 °C) é uma vantagem em relação aos processos com ácido diluído. Entretanto, alta concentração de ácido (por exemplo, 30-70%) no processo de ácido concentrado torna-se extremamente corrosivo e perigoso (TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

O melhor método e as condições de pré-tratamento dependem muito do tipo de material ligninocelulósico. Por exemplo, o pré-tratamento de folha de milho com um processo de ácido diluído parece ser promissor, mas este método não é eficaz para talos de milho (TAHERZADEH e KARIMI, 2008). Este fato pode estar ligado aos diversos fatores citados acima, cristalinidade, lignina, etc. No entanto, embora diversas técnicas de pré-tratamento sejam potencialmente aplicáveis à biomassa, salienta-se a importância de se aperfeiçoar o conhecimento acerca das diferenças entre os diversos tipos de pré-tratamento e a constituição da biomassa, a fim de se produzir polpa celulósica com elevada acessibilidade e reatividade da fibra, principalmente, aos agentes hidrolíticos enzimáticos (CARDOSO *et al.*, 2012; SOARES e ROSSELL, 2007).

A hidrólise enzimática é o outro desafio a ser superado para a utilização da celulose de resíduos ligninocelulósicos ou de qualquer outra cultura agrícola na geração de álcool de 2ª geração para produção econômica e tecnicamente viável.

Diversos estudos têm sido realizados na busca de enzimas capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, seja pela otimização de processos fermentativos, pela combinação de enzimas para a obtenção de complexos celulósicos mais eficientes ou pelo melhoramento de espécies através de métodos de engenharia genética (JORGENSEN *et al.*, 2005). Na hidrólise da celulose o sistema celulolítico é formado pelas enzimas endoglucanases,

exoglucanases e β -glicosidases. A endoglucanase é uma endoenzima que rompe aleatoriamente a cadeia de celulose (MEDVE, 1997). Esta enzima é capaz de quebrar a molécula de celulose no meio da cadeia para criar finais não redutores para subsequente ação das exoenzimas, atacando as ligações internas da cadeia da celulose na região amorfa, aumentando o número de terminais não redutores. As exoglucanases rompem as unidades a partir do final da cadeia. Tais enzimas são constituídas por dois tipos:

- Exo-celobiohidrolase: 1,4- β -D-glicano celobiohidrolase - remove resíduos de celobiose a partir do terminal não redutor. As exoenzimas atuam causando a inversão na configuração do carbono 1 do resíduo liberado.
- Exo-glicohidrolase: β -1,4-D- glicanase - remove resíduos de glicose a partir dos terminais não redutores da cadeia celulósica.

As β -glicosidases, também denominadas celobiasas, possuem a função de desdobrar a celobiose gerada pelas celobiohidrolases e endoglucanases em glicose. Atuam sobre a molécula de celobiose e outras celodextrinas de baixo peso molecular, produzindo glicose na configuração β , o que a diferencia de outras exoglicanases. A β -glicosidase não é considerada uma celulase específica, mas apenas uma enzima auxiliar da ação das celulases que são inibidas por elevadas quantidades de resíduos de celobiose (WOOD e GARCIA-CAMPAYO, 1990). As enzimas endo e exoglucanases em atuação conjunta solubilizam a celulose em celooligossacarídeos e celobiose (Figura 1.3) (BIRSAN *et al.*, 1998).

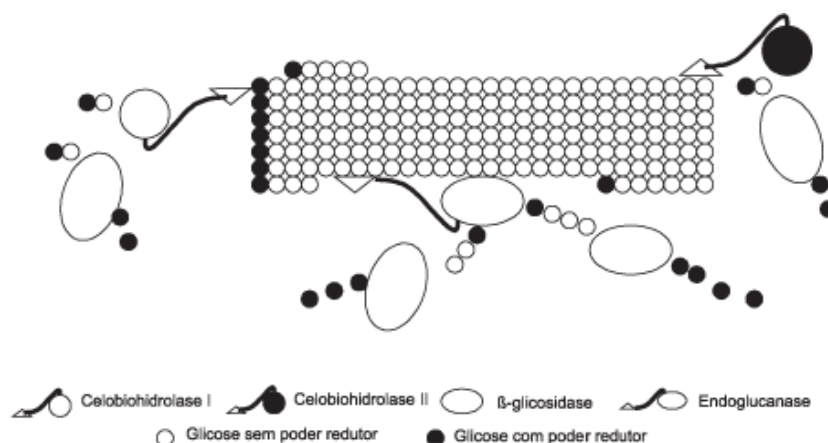


Figura 1.3 – Sinergia das enzimas envolvidas na hidrólise da celulose (CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

De acordo com Draetta e Lobo Filho (1980), a quantidade e propriedade das celulases produzidas por micro-organismo dependem das condições de crescimento ou fermentação.

Existem dois tipos de processos fermentativos que são utilizados para a produção de enzimas: fermentação submersa (FSm) e fermentação em estado sólido (FES). A produção de enzimas, pelo cultivo em estado sólido (FES), é uma alternativa atraente sob o ponto de vista econômico, como relatam os trabalhos de Tengerdy (1998), para produção de celulases, e de Castilho *et al.* (2000), para a produção de lipases. Em ambos os casos, nos quais foram utilizados resíduos agroindustriais como substrato, a obtenção das enzimas por FES, quando comparada com a FSm, apresentou significativa redução dos custos, o que foi atribuído, principalmente, ao baixo valor econômico do substrato utilizado. O custo da produção de celulase por FSm foi estimado em torno de \$40,36/kg, enquanto o custo por FES é de \$15,67/kg (ZHUANG *et al.*, 2007), redução de 60%.

De acordo com Madamwar e Patel (1992) uma das maiores motivações para os estudos que visam à obtenção de enzimas por FES é que, neste caso, obtém-se maior atividade enzimática por unidade de volume, o que favorece, consideravelmente, os processos de purificação, os quais representam um custo significativo na produção enzimática. Além disso, dados atuais mostram que a produção de enzimas por FES leva à obtenção de níveis de atividade superiores aos obtidos pelo cultivo submerso, além de se obter enzimas com propriedades funcionais mais adequadas às aplicações industriais (NIGAM e SINGH, 1994; MITCHELL *et al.*, 2000).

Diferentes tipos de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos (AIDOO *et al.*, 1982). Contudo, os fungos filamentosos são os mais adaptáveis a esse tipo de processo, pois são capazes de crescer com baixa atividade de água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecer a colonização do meio. Esse fato traduz-se na grande quantidade de aplicações e produtos obtidos pelo emprego desses micro-organismos.

A utilização de fungos em FES para produção de enzimas demonstra potencial para obtenção de celulasas, pois os fungos estão melhores adaptados para realizar a deterioração de restos insolúveis de planta (material ligninocelulósico) do que as bactérias, tanto através da sua forma física e modo de crescimento, tanto por sua capacidade enzimática e de metabolismo, como é demonstrado por fungos da podridão branca.

A maioria dos fungos da podridão branca produz enzimas hidrolíticas e oxidativas de forma a prover sua adaptação ao meio extremamente rico em ligninocelulose, principalmente madeiras mortas. Sendo fundamental a prospecção e a avaliação dos complexos multienzimáticos destes fungos potenciais, a fim de buscar novas fontes de enzimas capazes de contribuir nos processos de geração de biocombustíveis.

2 - OBJETIVOS GERAIS

Com intuito de contribuir com novos conhecimentos para a produção de etanol de segunda geração, o objetivo do trabalho foi:

- Avaliar as características da palha de uma variedade de sorgo forrageiro diante das operações unitárias principais do processo de produção de etanol celulósico, como os pré-tratamentos e a sacarificação enzimática.
- Estudar a produção, extração e caracterização dos complexos de enzimas celulósicas de fungos da podridão branca, cultivados em substratos de palha de sorgo forrageiro em FES.
- Produzir um coquetel mínimo de enzimas pela mistura dos complexos multi-celulases obtidos de fungos da podridão branca na FES da palha do sorgo.

3 - CAPÍTULO I

UTILIZAÇÃO DA PALHA DE SORGO (*Sorghum bicolor*) PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO: PRÉ- TRATAMENTOS E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

3.1 - INTRODUÇÃO

Em geral, denomina-se biomassa qualquer matéria de origem vegetal que pode ser processada para fornecer formas energéticas mais elaboradas e adequadas para uso final. Ao contrário da energia dos combustíveis fósseis, a biomassa é renovável e não contribui para o acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera terrestre (HALL, 1984).

Uma das grandes vantagens da biomassa é a variedade de formas de sua utilização. Pode-se usar biomassa como combustível, na forma de gases, líquidos ou sólidos. É um material versátil e provavelmente o único combustível primário que, na forma de álcool ou óleo, pode substituir a gasolina ou o diesel nos carros e caminhões. Por sua versatilidade, pode-se escolher o material que seja mais adequado ao solo, ao clima, e às necessidades socioeconômicas (GUARDABASSI, 2006).

As biomassas lignocelulósicas culturas energéticas e os resíduos (florestais, agrícolas e urbanos) podem oferecer os recursos renováveis para a produção de biocombustíveis de segunda geração (2G) (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006).

Tendo em vista a possível viabilização, em médio prazo, de rotas inovadoras para a produção de etanol, especialmente mediante à hidrólise de materiais celulósicos, cresce o interesse nas culturas energéticas, principalmente gramíneas de rápido crescimento e alta produtividade (LEMUS e PARRISH, 2009), como o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) (WOODARD e PRINE, 1993), normalmente utilizado como forrageira no Brasil, o switchgrass (*Panicum virgatum*), espécie nativa da América do Norte, que poderiam produzir vários cortes anuais (MCLAUGHLIN e KSZOS, 2005), além do capim alto do gênero *Miscanthus*, de maior interesse na Europa como fonte de biomassa celulósica (CLIFTON-BROWN *et al.*, 2001). Outra potencial cultura agrícola para a produção de etanol de segunda geração é o sorgo forrageiro (MONTI e VENTUR, 2003).

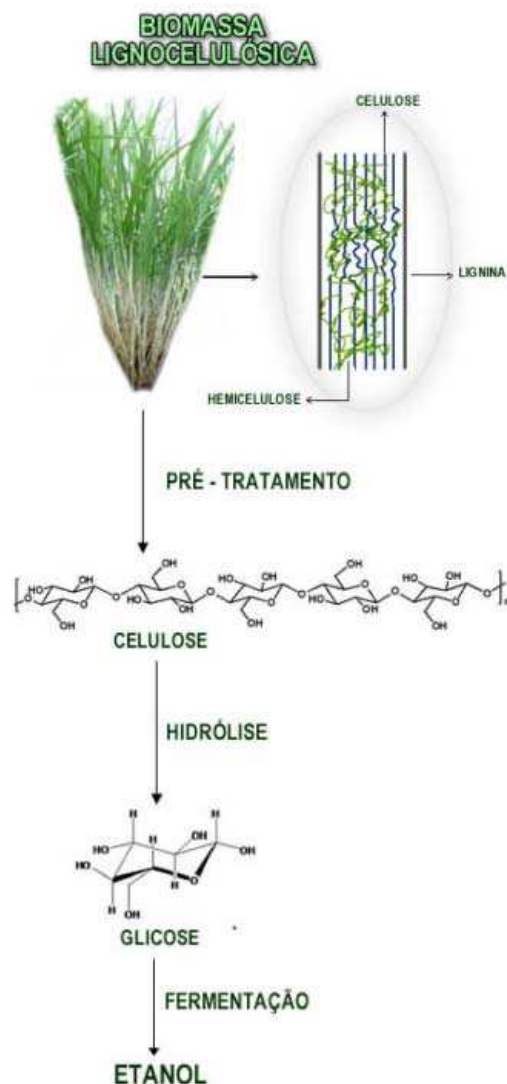


Figura 3.1- Esquema da utilização da biomassa para a produção de etanol. Fonte: SANTOS *et al.*, 2012.

O sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] é uma das principais culturas no cenário agrícola mundial, e dentre os atributos que o tornam altamente promissor, tem-se a grande diversidade genética, e a alta tolerância a estresses abióticos como a seca e o calor. Além disso, o sorgo requer menos fertilizantes do que o milho para obter alto rendimento (LIPINSKY e KRESOVICH, 1980) e pode tolerar ampla gama de condições do solo, desde argilosos pesados até areia clara, com pH variando de 5,0-8,5 (SMITH e FREDERIKSEN, 2000), bem como solos mal drenados. Isso o torna uma cultura adequada para o cultivo em condições

ideais, bem como em terras marginais onde outras culturas não se desenvolvem adequadamente.

Diferentemente da cana-de-açúcar, o sorgo pode ser cultivado a partir de sementes e apresenta um ciclo vegetativo bem mais curto, de 120 a 130 dias. Este cereal possui tolerância a períodos de estiagem durante seu ciclo e produz colheitas de grãos e massa verde, economicamente compensadora, em condições de pluviosidade baixa ou instável (NEUMANN *et al.*, 2002).

O sorgo no Brasil é cultivado principalmente para a produção de grãos e forragem, embora, também seja utilizado para produção de álcool, neste caso o sorgo sacarino (SAWAZAKI, 1998).

Baseado nos trabalhos de Rodrigues *et al.* (2008) e Machado (2009), pode-se concluir que o potencial de produção da variedade de sorgo forrageiro BRS 655, desenvolvido recentemente pela EMBRAPA, com aproveitamento somente das folhas e colmos, o que constitui a palha utilizada neste trabalho, e de cerca de 7,81 ton. de matéria seca/ha em 110 dias.

Considerando duas colheitas por ano pode-se obter cerca de 15,62 t/ha de biomassa seca, que poderia ser destinada a produção de etanol de segunda geração. Além, de outras 15,6 t/ha de panículas com alto valor para silagem ou diretamente para alimentação animal.

Na comparação, em relação à produção agrônômica, com outras culturas energéticas (Tabela 3.1), o sorgo forrageiro BRS 655 mostrou ser uma fonte potencial de biomassa ligninocelulósica.

Tabela 3.1 – Características agrônômicas de culturas promissoras para produção de biomassa (massa seca)

Cultura energética	Potencial de produção de biomassa (t/ha/ano)
Capim elefante (<i>Pennisetum purpureum</i>)	14 a 40 (WOODARD e PRINE, 1993)
<i>Switchgrass</i> (<i>Panicum virgatum</i>)	12 a 34 (MCLAUGHLIN e KSZOS, 2005)
Miscanthus (<i>Miscanthus x giganteus</i>)	18 a 29 (CLIFTON-BROWN <i>et al.</i> , 2001)
Sorgo Forrageiro BRS 655 (<i>Sorghum bicolor</i>)	15,6 (Adaptado de RODRIGUES <i>et al.</i> , 2008 e MACHADO, 2009)

Até o momento, processos de domesticação e de melhoramento genético resultaram em variedades de sorgo mais adequadas para a produção de grãos, forragem, silagem, açúcar e fibra. Entretanto, culturas dedicadas à produção de bioenergia, incluindo o sorgo, não foram melhoradas especificamente para seu total aproveitamento em produção de energia, e por isso pouco se sabe sobre as características relevantes a este sistema ou sobre a genética que controla tais fenótipos (VERMERRIS *et al.*, 2007). Para o melhoramento de sorgo visando à produção de energia, é importante identificar, caracterizar e quantificar a variabilidade genética disponível, bem como definir os fenótipos que sejam favoráveis à produção de etanol de segunda geração, como à composição ligninocelulósica e o comportamento destes materiais frente aos processos de pré-tratamento e sacarificação enzimática (DAMASCENO *et al.*, 2010).

A biomassa não-tratada é extremamente recalcitrante para digestão enzimática. Então, um grande número de tratamentos termoquímicos tem sido desenvolvido para melhorar a digestibilidade. O pré-tratamento rompe a parede celular da planta e melhora o acesso enzimático aos polissacarídeos. Vários estudos têm mostrado direta correlação entre a remoção de lignina e hemicelulose e a digestibilidade da celulose (GRAY *et al.*, 2006). Assim, o pré-tratamento é requerido para modificar a estrutura da biomassa ligninocelulósica para tornar a celulose mais acessível às enzimas que convertem os polímeros de carboidratos em açúcares fermentáveis. Um pré-tratamento eficiente pode substancialmente reduzir o requerimento de enzimas no processo de sacarificação da celulose e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção (MOSIER *et al.*, 2005).

Atualmente, os principais pré-tratamentos com potencial aplicação industrial são: Organosolv que emprega solventes orgânicos recuperáveis, capazes de remover a lignina. A explosão com vapor remove hemicelulose, e, em menor quantia, a lignina (DUFF e MURRAY, 1996). O pré-tratamento ácido diluído, chamado pré-hidrólise, consiste na hidrólise da fração hemicelulósica, que é mais susceptível ao tratamento ácido, sendo que as frações de celulose e lignina permanecem inalteradas. A hidrólise alcalina provoca aumento na área da superfície interna, diminuição no grau de polimerização e da cristalinidade,

separação da ligação estrutural entre lignina e carboidratos e rompimento da estrutura da lignina (SUN e CHENG, 2002). Após o pré-tratamento, a hidrólise enzimática de biomassa ligninocelulósica por celulases pode ser aplicada para sacarificação industrial de biomassa (SINGH *et al.*, 2009).

A sacarificação consiste na conversão enzimática dos polissacarídeos em açúcares fermentáveis. A celulose é hidrolisada, inicialmente, pelas endoglucanases, que clivam aleatoriamente o polissacarídeo, criando terminais livres para a atuação das exocelulases. As celobiohidrolases ou exocelulases atuam sobre cadeias de celulose liberando glicoses e celobioses. A última enzima necessária é a β -glicosidase que cliva celobioses em duas moléculas de glicose. Essa enzima é essencial para a sacarificação, pois celobiose é um inibidor das exocelulases. Para aumentar o rendimento e evitar inibições por glicoses e celobioses, presentes no meio têm sido utilizados o processo de sacarificação e de fermentação simultâneas. Desse modo, os açúcares liberados pela sacarificação são prontamente fermentados por micro-organismos, e, assim, não acumulam no meio, evitando a inibição das enzimas (BALAT *et al.*, 2008; HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006).

3.2 - OBJETIVOS

Com intuito de contribuir com novos conhecimentos para a produção de etanol de segunda geração, o objetivo do trabalho foi:

- Determinar a composição ligninocelulósica da palha do sorgo BRS 655;
- Avaliar a composição ligninocelulósica e rendimento das polpas obtidas da palha pré-tratada por 03 tipos de pré-tratamento: ácido, básico e ácido seguido por deslignificação.
- Realizar a hidrólise da palha in natura e das polpas obtidas dos pré-tratamentos;
- Comparar os complexos multienzimáticos celulolíticos obtidos dos fungos com enzimas comerciais na sacarificação da polpa celulósica do sorgo pré-tratado.

3.3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 - Material ligninocelulósico

O trabalho foi realizado com a palha (colmo e folhas sem as panículas com os grãos) do sorgo forrageiro BRS 655 (Figura 3.2). O cultivar BRS 655 foi desenvolvido pela Embrapa Milho e Sorgo e cultivado no município de Sete Lagoas.



Figura 3.2 – Palha do sorgo forrageiro BRS 655, utilizada neste trabalho.

A palha foi cortada com 120 dias de plantio, seca ao sol e posteriormente moída em picadeira. O material moído foi armazenado em local seco, ao abrigo de luz e umidade.

Excluído:

Para a condução dos pré-tratamentos os resíduos secos e triturados foram moídos em moinho de facas (modelo MR 340 – Marca Metalúrgica Roma), em partículas de 50 a 100 mesh.

3.3.2 - Pré-tratamentos

As condições dos pré-tratamentos aplicados estão descritos na Tabela 3.2. Estas condições de pré-tratamento foram determinadas em ensaios preliminares, sendo que tempos de reação acima de 30 minutos e ou concentrações de ácido ou base (H_2SO_4 ou $NaOH$) acima de 10%, provocaram a solubilização da celulose e a diminuição do rendimento em polpa.

Tabela 3.2 - Condições utilizadas nos pré-tratamentos da palha do sorgo forrageiro BRS 655.

	Pré-tratamentos			
	Básico (NaOH)	Ácido (H ₂ SO ₄)	Ácido seguido de deslignificação	
Massa de resíduo seco (g)	10	10	10	
Solução básica ou ácida (g.L ⁻¹)	50	50	50 (H ₂ SO ₄)	50 (NaOH)
Volume de solução (mL)	150	150	150	150
Temperatura de reação (°C)	120	120	120	120
Tempo (min)	15 e 30	15 e 30	15 e 30	15

O processo ácido seguido por deslignificação teve as condições de tempo, concentração de base e temperatura mantidas constantes, 15 min., 50 g.L⁻¹ e 120 °C, respectivamente, como na Tabela 3.2.

Foram adicionados 10 g de biomassa e 150 mL de solução ácida ou básica em erlenmeyer de 500 mL e os pré-tratamentos foram realizados em autoclave (modelo AV 80 - Marca Marconi). Após cada tratamento a mistura foi filtrada, separando-se o material em hidrolisado (filtrado) e polpa (material retido). A polpa foi lavada com água destilada, até a neutralização, observado pelo pH do líquido filtrado, medido em potenciômetro (Hanna pH 21). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

A polpa de cada pré-tratamento foi colocada em placas de Petri e secas a temperatura ambiente. Depois de seca a polpa foi embalada e estocada em geladeira. Da polpa foram determinados o teor de cinzas, a umidade e o rendimento do respectivo pré-tratamento, corrigido para peso seco. Para o controle (palha sem tratamento) também foram determinadas a umidade e cinzas. O rendimento em porcentagem foi calculado pela massa da material *in-natura* (massa seca) – massa da polpa obtida (massa seca), dividido pelo peso da material *in-natura* (massa seca). Da polpa ainda foram determinados o teor de hemicelulose, lignina e celulose.

Imagens da superfície dos materiais pré-tratados e controle foram feitas por microscopia de varredura do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM/UFV).

Para visualização morfológica do grau de destruição das biomassas, amostras foram colocadas sobre stubs, metalizadas com ouro e examinadas sob microscópio eletrônico de varredura (LEO VP1430).

3.3.3 - Métodos analíticos

Os teores de celulose e hemicelulose foram determinados pelos teores de FDA (Fibra em detergente ácido) e FDN (Fibra em detergente neutro) (VAN SOEST, 1991) e a determinação da lignina foi feita pelo método “Klason” ou lignina detergente ácido.

A solução em detergente neutro (3 % de Lauril sulfato de sódio, 0,4 % de Fosfato de sódio monobásico, 0,6 % de Borato de sódio deca-hidratado, 1,8 % de EDTA, 1 % de etilenoglicol dissolvidos em água destilada quente) é usada para dissolver substâncias facilmente digeridas, como a pectina e o conteúdo celular da planta (proteínas, açúcares e lipídeos) deixando um resíduo fibroso (fibra em detergente neutro – FDN), que são os principais componentes da parede celular das plantas (celulose, hemicelulose e lignina), proteína danificada pelo calor e proteína da parede celular. A solução detergente neutro é também usada para solubilizar proteínas, e o sulfito de sódio ajuda a remover alguns destes compostos nitrogenados. O EDTA é usado para quelatar o cálcio e remover a pectina na temperatura de refluxo. O trietileno glicol ajuda a remover alguns materiais não-fibrosos dos alimentos concentrados.

Para a determinação da fibra em detergente neutro (FDN) pesou-se cerca de 1 g de amostra, previamente triturada em moinho com peneira de 1 mm, em béquer de 600 mL e adicionou-se 100 mL de solução detergente neutro. Acrescentou-se 50 µl de amilase, estável ao calor. Os béqueres com as amostras foram colocados no aparelho digestor, aquecendo até ebulição por cinco minutos. Ajustou-se a temperatura para o refluxo da amostra e deixou por 60 minutos. Após 30 min. lavou-se os lados internos do béquer com quantidade mínima de solução de detergente neutro. Seguiu-se a filtração sob vácuo em cadinhos filtrantes previamente secos a 105 °C e pesados. Esta filtração foi realizada imediatamente após o refluxo do material, ainda quente. Lavou-se o béquer no mínimo duas vezes com água quente (90 a 100 °C), para quebrar a malha que se

forma, e encheu-se o cadinho a cada tempo com o vácuo desligado, permitindo que ficasse de molho por no mínimo 15 a 30 segundos a cada lavagem. Lavou-se o béquer igualmente por duas vezes com acetona (30 a 40 mL), enchendo o cadinho a cada tempo com o vácuo desligado permitindo que ficasse de molho por no mínimo 15 a 30 segundos. Filtrou-se sob vácuo até esgotar. Os cadinhos filtrantes com os resíduos foram secos em estufa por oito horas ou durante a noite a 105 °C., resfriando em dessecador e finalmente pesados.

A fibra em detergente ácido é a porção menos digerível da parede celular dos vegetais pelos microrganismos do rúmen. É constituída na sua totalidade de ligninocelulose, ou seja, lignina e celulose. Uma solução detergente ácida (2 % de CTBA – cetiltrimetil amônio brometo, 2,8 % de ácido sulfúrico, dissolvidos em 1000 mL de água destilada) é usada para dissolver o conteúdo celular, hemicelulose e minerais solúveis, deixando um resíduo fibroso constituído de celulose, lignina e proteína danificada pelo calor e parte da proteína da parede celular e minerais insolúveis.

Na determinação da fibra em detergente ácido (FDA) pesou-se cerca de 1,0 g de amostra seca ao ar, previamente moída em moinho com peneira de 1 mm. Colocou a amostra em béquer de 600 mL e adicionou 100 mL de solução detergente ácida. O béquer com as amostras foram colocados no aparelho digestor e aquecidos até ebulição por 5 minutos, reduziu-se o calor para evitar formação de espuma à medida que se iniciou a ebulição. Ajustou-se a temperatura para o refluxo da amostra após o início da ebulição e deixou por 60 minutos. Após 30 minutos, lavou-se os lados do béquer com quantidade mínima de solução em detergente ácido. Seguiu-se a filtração, sob vácuo, em cadinhos filtrantes previamente secos a 105 °C e pesados. Esta filtração foi realizada imediatamente após o refluxo do material, ainda quente. Lavou-se o béquer no mínimo duas vezes com água quente (90 a 100 °C), para quebrar a malha que se forma, e encheu-se o cadinho a cada tempo com o vácuo desligado, permitindo que ficasse de molho por no mínimo 15 a 30 segundos a cada lavagem. Lavou-se o béquer igualmente por duas vezes com acetona (30 a 40 mL), enchendo o cadinho a cada tempo com o vácuo desligado permitindo que ficasse de molho por no mínimo 15 a 30 segundos. Filtrou-se sob vácuo até esgotar. Os cadinhos

filtrantes com os resíduos foram secos em estufa por oito horas ou durante a noite a 100 °C., resfriando em dessecador e finalmente pesados.

A determinação da lignina, a fração menos digerível dos vegetais iniciou-se com os cadinhos filtrantes com os resíduos da fibra em detergente ácido em uma bandeja de vidro com água. Adicionou-se 30 mL de H₂SO₄ 72% (15 °C) em cada cadinho filtrante, para umedecer o conteúdo. Utilizou-se pequeno bastão de vidro em cada cadinho filtrante, para misturar o conteúdo e o ácido em forma de pasta. Adicionou-se mais 30 mL de ácido e mexeu até quebrar todos os grumos, permitindo que o ácido entrasse em contato com todas as partículas da amostra. Adiciona-se mais ácido até a metade do cadinho filtrante e deixou a 20 °C por uma hora. Após uma hora encheu-se os cadinhos novamente até a metade. Repetiu-se esta operação por três vezes. Depois os cadinhos foram submetidos filtração sob vácuo até esgotar a solução ácida e em seguida foram lavados por fora e por dentro com água quente (95 a 100 °C). Repetiu-se a operação até a retirada total do ácido. Secaram-se os cadinhos com os resíduos em estufa por oito horas ou durante a noite a 100 °C. As amostras foram resfriadas em dessecador até o equilíbrio com o ambiente e registro dos pesos. Em seguida colocaram-se os cadinhos na mufla a 500 °C e queimou por três horas. Removeram-se os cadinhos da mufla com a temperatura abaixo de 250 °C e transferiu-os para estufa a 105 °C, após 30 minutos resfriou-os em dessecador até o equilíbrio com o ambiente e registraram-se os pesos. O teor de lignina foi calculado pela perda de peso após a queima na mufla.

O teor de celulose foi estimado pela diferença entre o teor de fibra em detergente ácido menos os teores de lignina e cinzas. A hemicelulose foi determinada pela diferença entre FDN e FDA.

A determinação de cinzas e umidade seguiu os protocolos LAP 001 e LAP 005.

Para a determinação da umidade (LAP 001), da amostra homogeneizada pesou-se 1 a 5 gramas, no cadinho. Registrou-se o peso da amostra e o do cadinho. Em seguida a amostra foi colocada em estufa a 105 °C e seca até peso constante ($\pm$ mudança de 0,1% na quantidade de umidade presente sobre uma

hora de reaquecimento). Utilizou-se um dessecador para resfriar a amostra à temperatura ambiente antes da pesagem.

Para a determinação de cinzas (LAP 005), pesou-se de 0,5 a 1,0 g, da amostra no cadinho (com o peso já registrado), que seguiu para a mufla na temperatura de 575 ± 25 °C por um mínimo de três horas, ou até que todo o carbono fosse eliminado. Resfriou-se o cadinho no dessecador a temperatura ambiente e registrou-se o peso final. Cinzas é igual ao peso final da amostra carbonizada dividido pelo peso da amostra inicial.

As concentrações de açúcares redutores foram determinadas pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) descrito por Miller (1956). A determinação de açúcares redutores pelo método do DNS baseia-se na redução, em meio alcalino, do 3.5-dinitrosalicilato (coloração amarela). O produto formado é estável, com coloração laranja-avermelhado (3-amino 5-nitro salicilato) na proporção estequiométrica e máxima absorção da luz visível no comprimento de onda de 540 nm.

No preparo do reagente DNS, pesaram-se 10 g de ácido 3,5 - dinitrosalicílico e 300g de tartarato duplo de sódio e potássio. Em seguida, dissolveu-se o potássio no béquer, com aproximadamente 500 mL de água deionizada, e em outro separado foi decomposto, a quente, o ácido 3,5 - dinitrosalicílico em 200 mL de solução 2 M de NaOH. Depois, misturaram-se as duas soluções em um balão de 1,0 L, com agitação constante, completando-se o volume com água deionizada.

Quanto à curva de calibração, os padrões de glicose foram preparados tendo como base a solução- estoque de 1mg.mL^{-1} de acordo com a Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Procedimento para obtenção da curva padrão de açúcares redutores

Glicose (1mg.mL^{-1}) (mL)	Tampão Citrato (mL)	Quantd. DNS (mL)	Glicose μmol
0,0	2,0	3,0	0,00
0,25	1,75	3,0	1,39
0,5	1,5	3,0	2,78
0,75	1,25	3,0	4,17
1,0	1,0	3,0	5,56
1,5	0,5	3,0	8,33

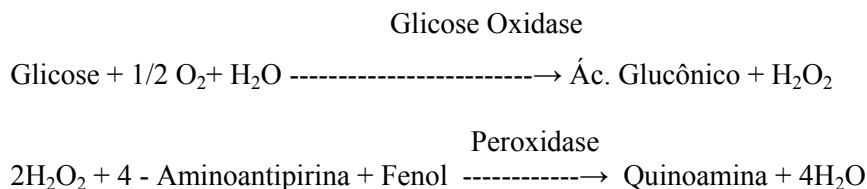
Depois da adição do reagente DNS, leva-se a mistura ao aquecimento até a ebulição por 5 minutos, tempo necessário para o desenvolvimento da cor. Na sequência, esfriaram-se as amostras que foram analisadas a 540 nm por meio de espectrofotômetro.

Montou-se o gráfico da concentração versus absorbância para encontrar a equação da curva de calibração de glicose pelo método do DNS, a equação foi utilizada para as determinações de açúcares redutores nos ensaios e sacarificações enzimáticas.

A determinação de glicose baseou-se na reação da glicose oxidase utilizando-se o kit glicose monoesterase BioClin AK 082 (Quibasa), onde 10 µL de amostra e 1,0 mL de mono-reagente de glicose oxidase foram colocados em tubos de ensaios permanecendo em banho Maria (Marconi MA-184) a 37 °C por 15 min. Ao final da reação, a absorbância foi lida no espectrofotômetro (PG Instruments – T70 + UV/VIS) a 505 nm. Uma curva padrão de glicose (padrão glicose Quibasa) foi preparada.

Os métodos enzimáticos proporcionam uma especificidade máxima para as determinações da glicose. A glicose pode ser determinada por sua reação com a glicose oxidase, na qual são gerados o ácido glicurônico e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O peróxido de hidrogênio então reage com um aceptor de oxigênio, como o fenol ou outros aceptores de oxigênio cromogênicos, numa reação catalisada pela peroxidase para formar uma cor (TRINDER, 1969):

Reação:



3.3.4 - Ensaios enzimáticos

Para a determinação da atividade Celulase total ou FPAse (Filter Paper Activity), o método foi realizado segundo Ghose (1986), com algumas modificações. Tiras de aproximadamente 1 x 6 cm (50 mg) de papel de filtro Whatman #1, recortadas e enroladas, foram adicionadas a tubos de ensaio pré-

incubados a 50 °C contendo 1,5 mL de tampão e 500 µL do extrato enzimático. Após 1h de incubação, a hidrólise foi interrompida com a adição de 3 mL de DNS, seguindo para a quantificação por este método.

A absorbância da solução foi medida a 540 nm e a concentração de açúcares redutores totais determinados com base em uma curva de calibração de glicose previamente estabelecida. Uma unidade de Celulase total (FPU) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 micromol de equivalentes de açúcar redutor total em um minuto, nas condições de ensaio.

3.3.5 - Sacarificação enzimática

O complexo enzimático Multifect GC (GENENCOR) foi utilizado para hidrólise enzimática do sorgo nativo e do sorgo pré-tratado. Outros reagentes utilizados foram adquiridos das empresas Sigma Chemicals ou Vetec Química, todos com pureza analítica (PA)

A sacarificação foi realizada sobre as polpas obtidas de cada tipo de pré-tratamento e o sorgo não tratado. A sacarificação adaptou a metodologia sugerida pela LAP 008. Foi acompanhando a produção de glicose até 48 horas de hidrólise.

A carga enzimática (FPU) de Celulase total ou FPase foi, de 50 FPU/g de material ligninocelulósico. A concentração de material ligninocelulósico foi de 1%, em 30 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. Azida de sódio (0,1% p/v) foi utilizada para inibir crescimento microbiológico durante a hidrólise enzimática.

Os experimentos de sacarificação foram conduzidos em Erlemeyer de 125 mL, em shaker (Tecnal - TE – 421) agitado a 120 rpm, à temperatura de 50 °C. Amostras de 0,5 mL foram retiradas a cada 6 h até 12 h, e depois de 12 em 12 h até 48 h, sendo que cada amostra foi aquecida a 100 °C por 5 min. para inativação das enzimas, centrifugado e retirado o sobrenadante para posterior determinação da concentração de glicose.

3.3.6 - Análises estatísticas

Na comparação entre os pré-tratamentos, foram realizados 7 tratamentos: 3 tipos de pré-tratamentos em dois tempos de reação, mais o controle (palha *in-natura*), com 3 repetições, totalizando 28 ensaios.

Os pré-tratamentos foram avaliados quanto aos rendimentos e aos teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, por análise de variância (ANOVA) e teste de média (Tukey), ao nível de significância de 5%. Utilizou-se o software SAEG (UFV, 2007).

3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 - Caracterização ligninocelulósica da palha de sorgo

A composição ligninocelulósica da palha de sorgo forrageiro BRS 655 avaliada neste trabalho está mostrada na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Composição ligninocelulósica da palha de sorgo

Componente	% base seca
Celulose	35,87
Hemicelulose	26,04
Lignina	7,52

Os conteúdos em celulose, hemicelulose e lignina da palha do sorgo forrageiro (Tabela 3.4) estão próximos ao de Dogaris *et al.*(2009), que na avaliação do bagaço do sorgo encontrou cerca de 40,4, 35,5 e 3,9 % (base seca) para os teores de celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente.

O teor de lignina da palha avaliada neste trabalho se encontra dentro da faixa de 2,0 a 11,2% (ms) de lignina dos 35 diferentes genótipos de sorgo avaliados por Damasceno *et al.* (2010).

Em relação à outra cultura energética o capim elefante, os resultados obtidos apresentaram valores semelhantes de 30,94% para a celulose; 30,72% para a hemicelulose e 8,54% de lignina (SANTOS *et al.*, 2001).

Destaca-se nesta variedade de sorgo o baixo teor de lignina, o que potencializa pré-tratamentos mais brandos e mais econômicos, possibilitando melhores rendimentos na sacarificação e fermentação. A redução do conteúdo de lignina das plantas potencialmente aumenta a produção de açúcares, permite uma redução na severidade do pré-tratamento, e possibilita uma menor carga de enzimas durante a hidrólise (DIEN *et al.*, 2009).

3.4.2 Pré-tratamentos

Os rendimentos em relação ao tempo de reação dos pré-tratamentos (Tabela 3.5), não apresentaram diferenças dentro do mesmo tipo de pré-tratamento em relação ao tempo de reação ($p < 0,05$), no entanto, apresentou

diferença significativa entre os tipos de pré-tratamentos, apresentando os seguintes valores médios 51%, 38% e 26%, para os processos ácidos, básicos e o ácido seguido por deslignificação, respectivamente. Em relação o pré-tratamento ácido diluído, Silva (2009) obteve um rendimento semelhante de 57% quando realizou este pré-tratamento, numa temperatura de 120 °C, 10 min, H₂SO₄ 1% (m/v), relação sólido-líquido 1:10 (m/v) e agitação de 120 rpm.

Tabela 3.5 – Composição lignocelulósica da palha de sorgo BRS 655 *in natura* e das polpas obtidas após os pré-tratamentos, conforme tabela 3.4. Média e desvio padrão de 3 repetições

Amostras	Tempo de reação (min)	Rendimento (%) m.s.	Celulose (g/100g) m.s.	Hemicelulose (g/100g) m.s.	Lignina (g/100g) m.s.	Cinzas (g/100g) m.s.
Palha de sorgo nativo			35,87 D ± 0,75	26,04 A ± 0,50	7,52 B ± 0,90	2,18 A ± 0,12
Não-tratado						
Pré-tratamento ácido (Polpa ácida)	15	52,0 A	66,39 A ± 1,80	1,25 C ± 0,18	30,00 A ± 1,55	2,35 A ± 0,08
	30.	50,4 A	66,61 A ± 2,99	0,87 C ± 0,15	30,24 A ± 2,84	2,25 A ± 0,05
Pré-tratamento básico (Polpa básica)	15	37,9 B	88,44 B ± 1,63	8,00 B ± 1,51	0,86 C ± 0,12	2,70 A ± 0,07
	30	38,3 B	87,89 B ± 0,38	8,38 B ± 0,54	0,87 C ± 0,15	2,86 A ± 0,14
Pré-tratamento ácido com deslignificação	15	26,5 C	96,54 C ± 0,43	1,24 C ± 0,30	1,57 C ± 0,17	0,65 B ± 0,05
	30.	25,6 C	97,14 C ± 0,33	1,22 C ± 0,18	0,90 C ± 0,10	0,75 B ± 0,05

Médias seguidas pela mesma letra (coluna) não diferem-se entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

De modo geral, para os diferentes pré-tratamentos, o tempo de reação, (15 ou 30 min) não influenciou a composição final da polpa (Tabela 3.5). Por outro lado, o tipo de pré-tratamento aplicado afetou todos os parâmetros analisados.

O tratamento ácido diluído diminuiu em cerca de 95% a fração hemicelulose, no entanto, houve uma concentração da lignina e da celulose. O pré-tratamento ácido não é eficaz em dissolver a lignina, mas pode desorganizá-la e aumentar a susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática (WYMAN, 1996).

O tratamento básico removeu, cerca de 90% da lignina e reduziu o teor de hemicelulose em mais de 70%. O principal efeito do pré-tratamento alcalino

consiste na remoção da lignina, promovendo maior reatividade da fibra. Silverstein *et al.*, (2007) estudaram a eficácia dos pré-tratamentos com ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio e ozônio para a conversão enzimática de caules de algodão. Os autores observaram que o tratamento com hidróxido de sódio resultou no mais alto nível de deslignificação 65% (2% de NaOH em 90 min. a 121 °C), valor abaixo do observado neste trabalho.

No tratamento do sorgo com ácido seguido por deslignificação obteve-se polpa com o maior teor de celulose (96%) e baixa concentração de lignina (1,2%) e hemicelulose (1%).

Analizando os dados de rendimentos de cada pré-tratamento com a composição ligninocelulósica da palha nativa e das polpas obtidas, tem-se que os pré-tratamentos, ácido, básico e ácido seguido pela deslignificação, causaram perdas de celulose na ordem de 5,5%, 25,9% e 29,8 %, respectivamente. Silva (2009) também observou uma perda de celulose de 30% em pré-tratamento ácido seguido por deslignificação da palha de milho.

Os resíduos agrícolas em geral apresentam comportamentos diferentes quanto à susceptibilidade da hidrólise da fração celulósica, alcançando até 50% de degradação da celulose em experimentos realizados a temperaturas variando entre 150-230 °C na faixa de aplicação de um pré-tratamento hidrotérmico (GARROTE *et al.*, 1999), portanto, a temperatura de 120 °C utilizada neste trabalho favoreceu menor degradação de celulose. Porém, outros fatores como a relação sólido/líquido e o tempo de reação empregado também são importantes para o controle da degradação da fração celulósica evitando a perda de rendimento no processo.

3.4.3 Morfologia da palha de sorgo *in natura* e pré-tratada por microscopia de varredura

Características morfológicas de amostras de biomassa de sorgo não tratada e após os pré- tratamentos podem ser visualizados na figura 3.3.

O material não tratado (Figura 3.3.1) apresenta uma superfície lisa, fechada e integra.

Corredor *et al.*, (2009), avaliaram as características morfológicas de diferentes variedades de sorgos forrageiro em microscopia de varredura, e atribuíram a característica da superfície lisa, do material não tratado, como sendo devido a presença de ceras, hemicelulose, lignina e outros materiais de ligação.

Na palha pré-tratada, tanto por 15 quanto por 30 minutos (Figura 3.3.2 e 3.3.3), observa-se o rompimento do parênquima e a remoção da superfície externa, expondo a estrutura interna.

No pré-tratamento básico (Figuras 3.3.4 e 3.3.5), o sorgo teve total remoção da superfície externa e a exposição de fibras de celulose.

O sorgo pré-tratado com ácido seguido por deslignificação (Figuras 3.4.6 e 3.4.7) apresenta fibras de celulose individuais e há presença de anéis anulares. Os anéis anulares são componentes das células traqueais do protoxilema das gramíneas, responsável pelo alongamento e rigidez deste vaso, o protoxilema é densamente lignificado (KAKOSOVA *et al.*, 2006), a presença desses anéis mostra uma eficiência na retirada da lignina das gramíneas.

Essas imagens confirmam que as camadas externas e internas são as estruturas removidas durante o pré-tratamento, incluindo parte da celulose. As imagens corroboram com as análises químicas, as quais evidenciam uma grande solubilização dos componentes, e visível aumento de sua área superficial, tornando as fibras mais expostas ao ataque enzimático.

Oliveira (2009), também observou que o processo de deslignificação da palha de cana pré-tratada com ácido diluído proporcionou um realce das fibras ricas em celulose.

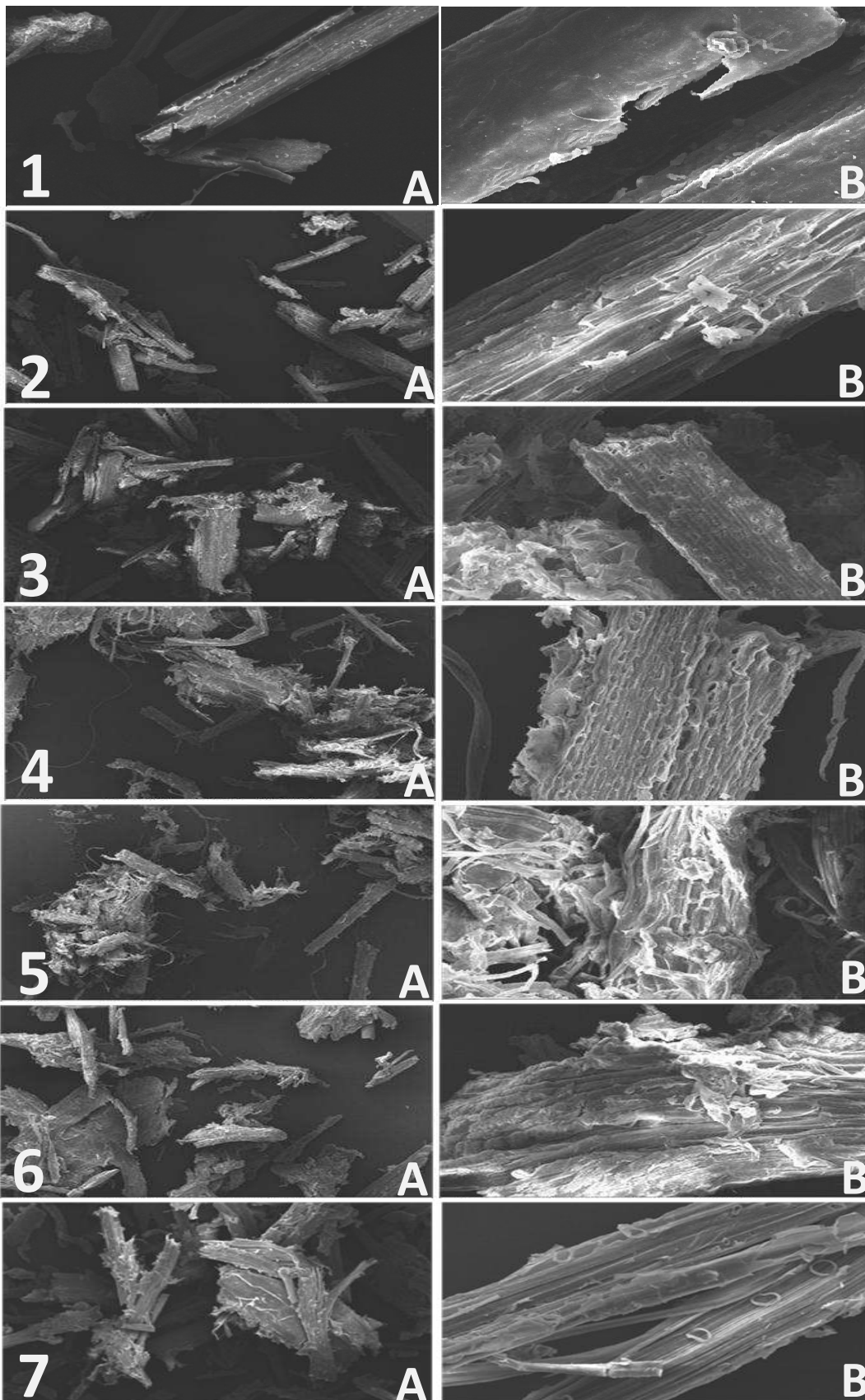


Figura 3.3 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura da palha de sorgo. **1** - Material não tratado. **2** - Material pré-tratado por ácido diluído (5%) por 15 min a 120 °. **3** - Material pré-tratado por ácido diluído (5%) por 30 min a 120 °C. **4** - Material pré-tratado por alcali (5%) por 15 min a 120 °C. **5** - Material pré-tratado por alcali (5%) por 30 min a 120 °C. **6** - Material pré-tratado por ácido diluído (5%) por 15 min a 120 °C, seguido por deslignificação básica (5%) por 30 min a 120 °C. **7** - Material pré-tratado por ácido diluído (5%) por 30 min a 120 °C, seguido por deslignificação básica (5%) por 30 min a 120 °C. **A** - aumento de 40X, **B** – aumento de 736X.

3.4.4 Sacarificação

As fotografias dos materiais pré-tratados e a palha de sorgo *in natura* (não tratada) podem ser visualizadas na (Figura 3.4).

Na Figura 3.4, pode-se observar diferença de cor entre os materiais. A polpa ácida encontra-se mais escura que a palha *in natura*, devido à concentração da lignina. A polpa ácida/deslignificada apresentou-se mais clara em relação às demais, possivelmente devido ao maior conteúdo de celulose e ao baixo teor de lignina.

A palha de sorgo *in natura*, e as polpas tratadas por 30 min., com ácido, base e ácida/deslignificada foram sacarificadas utilizando-se o complexo enzimático Multifect CG.

Os patamares de hidrólise foram alcançados em 24 h. para todas as polpas, permanecendo praticamente constante nas outras 24 h. (Figura 3.5).

Na hidrólise enzimática das biomassas a polpa ácida e o sorgo *in natura* apresentaram baixos índices de hidrólise, não atingindo um percentual de 40%. O pré-tratamento ácido diluído apesar de promover um aumento na hidrólise enzimática em comparação ao material nativo, não proporcionou rendimentos de hidrólise superiores a 40%.

As hidrólises enzimáticas das biomassas, resultantes dos pré- tratamentos básicos e polpa ácida deslignificada foram muito superiores ao pré-tratamento ácido, alcançando níveis próximos de 95% de biomassa sacarificada para a polpa ácido/deslignificada, e 85% para a polpa básica após 48 horas.



Figura 3.4 – Imagem dos materiais utilizados na sacarificação enzimática. **a** - palha de sorgo forrageiro moída não tratada; **b** - polpa pré-tratada por ácido diluído (5%) por 30 min. a 120 °C; **c** - polpa pré-tratada por álcali (5%) por 30 min. a 120 °C; **d** - polpa pré-tratada por ácido diluído (5%) por 30 min. a 120 °C seguido por deslignificação básica (5%) por 30 min. a 120 °C.

Estes resultados podem ser explicados, em parte, pela presença da lignina na palha *in natura* e na polpa ácida e sua ausência nas demais polpas. A lignina retarda a ação das celulases em múltiplos caminhos: barreira física, impede a hidratação da fibra de celulose e liga-se não especificamente às proteínas (DAMASCENO *et al.*, 2010).

O teor de lignina e sua distribuição constituem o fator responsável pela recalcitrância de materiais ligninocelulósicos à degradação enzimática, limitando a acessibilidade da enzima. Isto explica a melhoria nas taxas de hidrólise enzimática dos materiais submetidos aos processos de deslignificação (KASSIM e EL-SHAHED, 1986).

A deslignificação da palha de cana pré-tratada com ácido diluído favoreceu a etapa de sacarificação, fazendo com que o percentual de conversão atingisse 84,5% (OLIVEIRA, 2010), corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Considerando a sacarificação em relação ao conteúdo de celulose, não houve diferença significativa, para as polpas obtidas do pré-tratamento básico e ácido seguido por deslignificação (Figura 3.5). Este resultado mostrou que o efeito da lignina sobre a sacarificação é mais forte do que o da hemicelulose, pois

na sacarificação da polpa básica, que possui o mesmo nível de lignina da polpa ácida deslignificada, e cerca de 8,0% de hemicelulose, foi alcançado o mesmo nível de hidrólise obtido na polpa ácida deslignificada, que possui menos de 1% de hemicelulose.

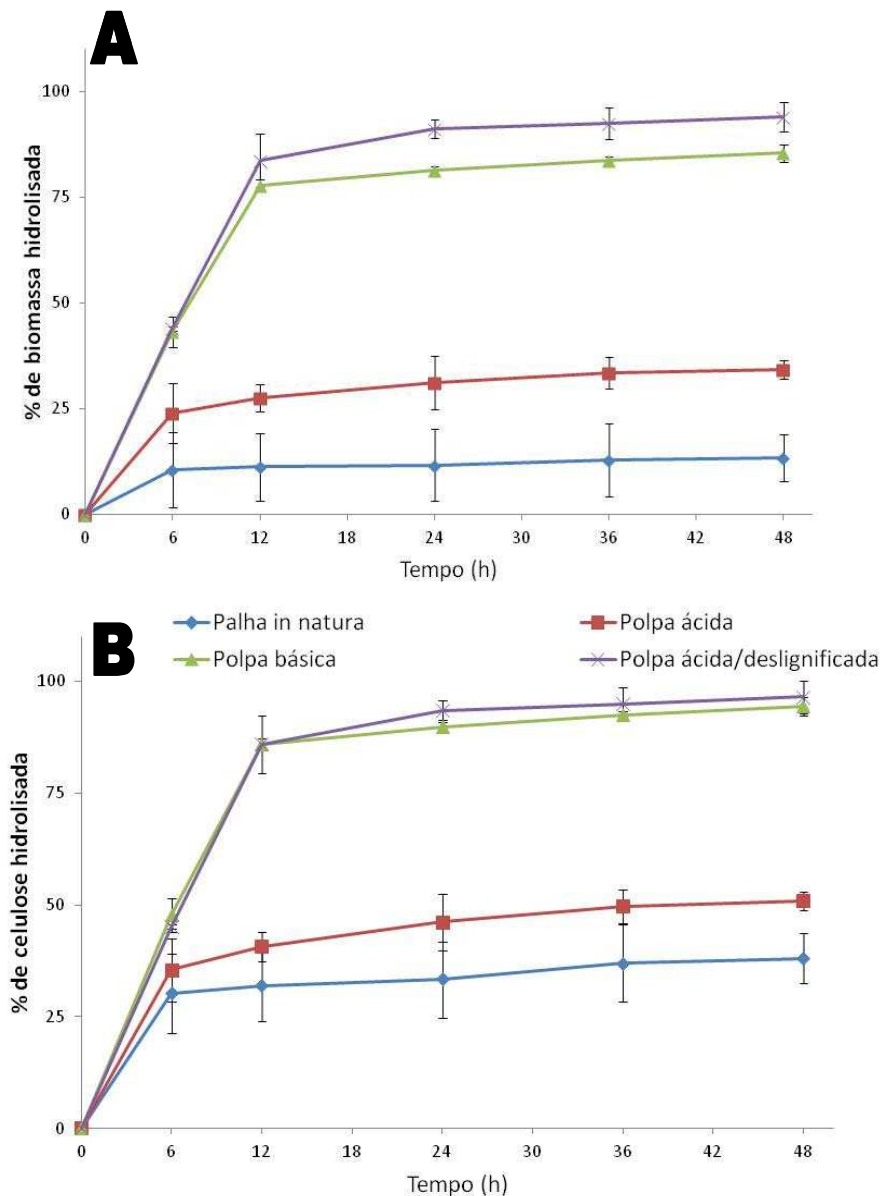


Figura 3.5 – Sacarificação do sorgo forrageiro não tratado e das polpas obtida do sorgo após aplicação de pré-tratamentos. % biomassa total (A) e % de celulose na biomassa (B).

Segundo a literatura, tanto a hemicelulose quanto a lignina formam uma barreira física contra o ataque enzimático à celulose, sendo a lignina um dos

principais fatores que limitam a hidrólise enzimática da celulose (BERLIN *et al.*, 2005). Neste trabalho observou-se que o efeito da hemicelulose na hidrólise enzimática é irrelevante quando comparado ao da lignina.

Zhao *et al.* (2007) relataram que o pré-tratamento com NaOH proporcionou uma maior taxa de conversão enzimática de celulose em comparação ao pré-tratamento com H₂SO₄, o que também foi evidenciado nos resultados obtidos neste trabalho. Em comparação com os pré-tratamentos ácido ou de reagentes oxidativos, o tratamento alcalino parece ser o mais eficaz método de quebrar as ligações éster entre lignina, hemicelulose e celulose.

Os resultados obtidos corroboraram com os relatados da literatura evidenciando que a remoção da lignina e outros componentes pelas etapas de pré-tratamento provocam uma extensa mudança na estrutura morfológica da biomassa ligninocelulósica, conforme mostrado nas figuras 3.3.4, 3.3.5, 3.3.6 e 3.3.7. Estas transformações tornam a celulose mais acessível ao contato com as enzimas celulolíticas proporcionando, um aumento da conversão de biomassa ligninocelulósica em glicose e consequentemente em etanol.

Dien *et al.* (2009) compararam linhas isogênicas de sorgo forrageiro com e sem os genes bmr (relacionado com o conteúdo de lignina na planta de sorgo) quanto à eficiência do processo de conversão da biomassa em glicose. Os autores verificaram que as linhagens que apresentavam os genes bmr-6 e bmr-12 foram igualmente eficientes na redução do conteúdo de lignina e que houve um efeito aditivo na redução com o mutante duplo bmr-6/bmr-12. As amostras de sorgo sofreram pré-tratamento com ácido diluído antes de sacarificação por celulasas. Quando comparada à linhagem não mutante, a liberação de glicose foi mais eficiente nos mutantes, com um aumento de 27%, 23% e 34% em termos de glicose liberada pelos mutantes bmr-6, bmr-12 e o mutante duplo, respectivamente. Resultados similares foram obtidos quando o pré-tratamento foi feito com bases diluídas. Assim, os autores concluíram que a redução do conteúdo de lignina pode apresentar um impacto positivo na eficiência de conversão da biomassa em açúcares simples, o que ficou evidenciado neste trabalho em relação à sacarificação das polpas de menor conteúdo de lignina.

3.5 - CONCLUSÕES

O sorgo forrageiro BRS 655 é uma alternativa para produção de etanol de segunda geração. Esta cultivar destaca-se por sua constituição com baixo teor de lignina.

O sorgo apresenta-se também como um material susceptível aos pré-tratamentos, de modo, que processos brandos conseguem diminuir os teores de hemicelulose e lignina, resultando em uma polpa de alto teor de celulose.

O pré-tratamento básico a 5%, 1:15 (biomassa: solução alcalina), por 15min. a 120 °C, é suficiente para proporcionar uma alta digestibilidade enzimática (86%) da palha do sorgo forrageiro.

4 - CAPÍTULO II

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS DE FUNGOS DE
PODRIDÃO BRANCA, POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO.**

4.1 - INTRODUÇÃO

A celulose, a hemicelulose e a lignina compõem as biomassas (Figura 4.1) que podem ser utilizadas para a produção de bicomcombustíveis. A celulose é uma das substâncias renováveis mais abundantes no globo terrestre, motivo pelo qual a mesma tem sido extensivamente estudada como fonte de energia sustentável para uso industrial.

A celulose é um homopolissacarídeo linear formado de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$. As cadeias de celulose agregam-se formando fibrilas e apresentam pontes de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila intra e intercadeias, o que resulta na cristalinidade da celulose. Essas regiões cristalinas, nas quais as cadeias estão ordenadas paralelamente, são separadas por regiões menos ordenadas, conhecidas como amorfas (SANTOS *et al.*, 2012).

O processo de sacarificação da celulose, para a produção de etanol, é complexo e o teor de açúcares fermentescíveis a ser obtido é inferior ao encontrado nas matérias-primas sacarinas (AQUARONE *et al.*, 2001).

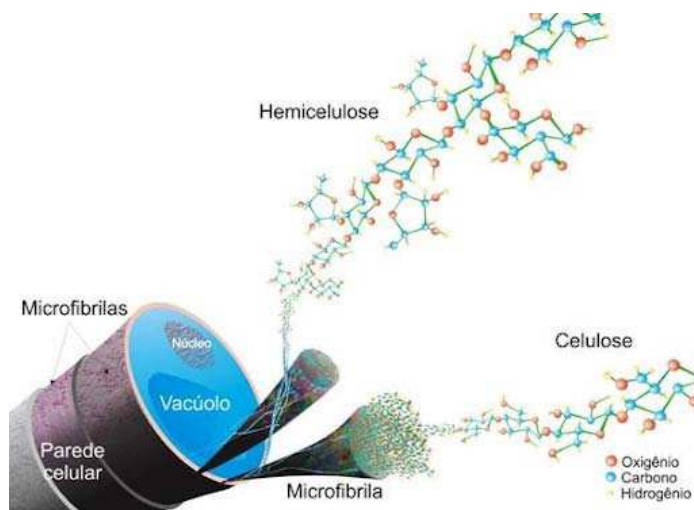


Figura 4.1- Estrutura e composição básica da biomassa vegetal. Fonte: <http://mundodacana.blogspot.comL>

Vários trabalhos tentam verificar a viabilidade da sacarificação da celulose via hidrólise enzimática, utilizando majoritariamente os complexos celulósicos produzidos por fungos filamentosos como o *Trichoderma reesei* (PALONEN *et al.*, 1999). Outros fungos de ocorrência natural também apresentam complexos

enzimáticos capazes de degradar eficientemente a celulose. Dentre eles podem ser citados o *Humicola insolens*, *H. grisea*, *T. viride*, *Aspergillus niger*, *Penicillium brasilianum* e *P. echinulatum*

Os fungos e suas enzimas possuem potencial para atuar em diversos processos onde haja a necessidade de degradação ou desconstrução biológica, sendo que na produção de etanol podem ser inseridos nos processos de pré-tratamento e sacarificação enzimática da celulose e hemicelulose. Os fungos da podridão branca (*white rot fungi*) são basidiomicetos e alguns ascomicetos que possuem a capacidade de degradar a lignina e a celulose presente em madeira ou resíduos agrícolas (LEONOWICZ, 1999). A maioria dos fungos da podridão branca produz enzimas hidrolíticas e oxidativas de forma a prover sua adaptação ao meio rico em ligninocelulose (VALASKOVÁ e BALDRIAN, 2006).

O sistema celulolítico dos fungos da podridão é formado por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. As endoglucanases são enzimas que rompem aleatoriamente a cadeia de celulose (MEDVE, 1997). As exoglucanases atuam no rompimento das unidades de glicose a partir do final da cadeia. As enzimas endo e exoglucanases em atuação conjunta hidrolisam a celulose em celooligossacarídeos e celobiose (BIRSAN *et al.*, 1998). As β -glicosidases, também denominadas celobiasas, possuem a função de desdobrar a celobiose gerada pelas celobioidrolases e endoglucanases em glicose (WOOD e GARCIA-CAMPAYO, 1990).

Segundo Lee (1997), para converter os materiais ligninocelulósicos em etanol é necessário, após os pré-tratamentos, proceder a despolimerização da celulose para produzir açúcares livres através de enzimas celulasas que são produzidas por uma série de micro-organismos, porém, o custo para obtenção dessas enzimas é elevado. A utilização dos fungos de podridão branca e seus complexos multi-celulasas gerado por FES em resíduos ligninocelulósicos como substrato, além de baixo custo podem oferecer enzimas mais eficientes (NIGAM e SINGH, 1994; MITCHELL *et al.*, 2000).

A produção de enzimas celulolíticas, pelo cultivo em estado sólido (FES) é uma alternativa atraente, sob o ponto de vista econômico, pois apresenta significativa redução dos custos, o que foi atribuído, principalmente, ao baixo

valor econômico do substrato utilizado (TENGARDY, 1998; CASTILHO *et al.*, 2000).

Embora nenhuma iniciativa tenha ainda alcançado estágio de viabilidade comercial (as barreiras são os elevados custos do complexo enzimático, a baixa taxa de conversão da celulose em açúcares, a necessidade de pré-tratamento para conseguir conversões eficientes), a tecnologia de hidrólise enzimática apresenta grande potencial em virtude de características como a especificidade da reação, ausência de reações secundárias (que levariam à perda de rendimento), ausência da formação de produtos secundários (inibidores da fermentação alcoólica) e reação em condições suaves que não requerem altas pressões e temperaturas ou ambientes corrosivos para os equipamentos (ADSUL *et al.*, 2005; CGEE, 2005; HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006; BASTOS, 2007).

4.2 - OBJETIVOS

A hidrólise enzimática possibilita utilização mais eficiente dos carboidratos. Assim, com vista a avaliar todo o potencial de celulasas de fungos da podridão branca em fermentação em estado sólido, o objetivo do trabalho foi:

- Avaliar a produção de celulasas por fungos da podridão branca em fermentação em estado sólido da palha do sorgo.
- Caracterizar os complexos multienzimáticos celulolíticos (extratos) produzidos por fungos da podridão branca em fermentação em estado sólido da palha do sorgo;
- Avaliar a sacarificação da palha de sorgo pré-tratada pelos complexos multienzimáticos dos fungos da podridão branca em FES da palha do sorgo e também por enzimas comerciais.

4.3 - MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 - Produção do complexo de celulasas por fermentação no estado sólido

Para a fermentação em estado sólido, utilizou-se palha do sorgo forrageiro BRS 655 (colmo e folhas sem a panícula com os grãos), cultivar desenvolvido pela Embrapa Milho e Sorgo e cultivado no município de Sete Lagoas. O sorgo foi cortado com 120 dias de plantio e seco ao sol, triturado em picadeira e armazenado em local seco, ao abrigo de luz e umidade.

A palha de sorgo foi umedecida para umidade final de 60%. Cada 100 g de substrato preparado foram acondicionadas em sacos de polipropileno com filtro e fechados com fita adesiva para posterior autoclavagem.

Depois de esterilizado a 121 °C por 90 minutos e resfriado à temperatura ambiente, cada saco de polipropileno com substrato recebeu dois discos de 2 cm de diâmetro do micélio de cada fungo previamente cultivado em placa de Petri com BDA por 7 dias a 30 °C.

Foram avaliados o potencial enzimático dos fungos de podridão branca, *Pleurotus ostreatus* PLO 06, *Pleurotus eryngii* PLE04, *Trametes versicolor* TRAM01, *Pycnosporus sanguineus* PYC02 e *Phanerochaete chrysosporium* PC, oriundos da coleção do Departamento de Microbiologia/UFV.

A metodologia de cultivo foi descrita por Silva (2001). Na replicação, os fungos foram mantidos em tubos de ensaio, contendo o meio de cultivo batata dextrose ágar (BDA), esterilizado a 121 °C por 15 min. Após o crescimento fúngico por 7 dias a 30 °C, os tubos foram refrigerados a 4 °C. Posteriormente, os fungos foram novamente replicados em placa de Petri, para a retirada do inóculo na forma de discos de 2 cm.

Os sacos foram inoculados em capela de fluxo laminar e incubados em uma BOD em temperaturas controladas a 28 °C, até a completa colonização do substrato. O acompanhamento do crescimento micelial foi realizado visualmente. Depois de alcançada a total colonização, com cerca de 20 dias para todos os fungos, avaliou-se as atividades das enzimas celulolíticas em vários dias após a inoculação.

4.3.2 - Obtenção do extrato enzimático

Amostras de 5 g de substrato, foram colocadas em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de tampão citrato de sódio (50 mM e pH 4,8) e agitadas a 150 rpm por 2 horas a 5 °C. Em seguida, filtradas em peneiras e colocadas em tubos Eppendorf de 2 mL, seguindo para centrifugação a 12000 g a 5 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf, sendo posteriormente identificados com o fungo e tempo de incubação, fechados e armazenados em freezer a -18 °C.

4.3.3 - Ensaio enzimáticos

Para a determinação da atividade de Celulase total ou FPase, utilizou-se o método descrito por Ghose (1986), com algumas modificações. Tiras de aproximadamente 1 x 6 cm (50 mg) de papel de filtro Whatman #1, recortadas e enroladas, foram adicionadas a tubos de ensaio pré-incubados a 50 °C contendo 1,5 mL de tampão e 500 µL do extrato enzimático. Após 1h de incubação, a hidrólise foi interrompida com a adição de 3 mL de DNS, seguindo para a quantificação por este método (MILLER, 1956).

A absorbância da solução foi medida a 540 nm e a concentração de açúcares redutores totais foi determinada com base em uma curva de calibração de glicose previamente estabelecida. Uma unidade de FPase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de equivalentes de açúcar redutor total em um minuto, nas condições de ensaio.

A atividade de β-glicosidase (EC 3.2.1.21) foi determinada incubando-se 1mL do substrato p-nitrofenil-β-D-glicosídeo 0,005M, em tampão citrato 0,05M, pH 4,8 com 100 µL do complexo enzimático, por 15 minutos a 50 °C. A reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de bicarbonato de sódio 1,0 M e a absorbância medida a 410 nm. A unidade de atividade enzimática de β-glicosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de p-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio.

A medida da atividade de AVICELase ou exoglucanase (EC 3.2.1.91) consistiu na adição de 250 µL do complexo enzimático bruto em 1 mL de

solução 1% de celulose microcristalina (AVICEL), em tampão citrato 0,05M, pH 4,8 e incubado a 50 °C por 30 min.. Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS). A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcares redutores total (equivalentes de glicose) por minuto nas condições de ensaio.

A atividade de CMCase ou endoglucanase (carboximetilcelulase, EC 3.2.1.4) consistiu também na adição de 250 μ L do complexo enzimático em 1 mL de solução de carboximetilcelulose 1% em tampão citrato 0,05M, pH 4,8 e incubado a 50 °C por 30 min.. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS). A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcares redutores totais (equivalentes de glicose) por minuto nas condições de ensaio.

A atividade da xilanase (endo-1,4- β -xilanase, EC 3.2.1.8) foi determinada na mistura de 1mL do complexo enzimático, 1 mL de solução de xilana 1% (xilana *birchhood* – sigma), em tampão citrato 0,05 M, pH 4,8 e incubação a 50 °C por 30 min. sendo o sistema enzima-substrato agitado periodicamente para manter a xilana em suspensão. Após a reação, adicionou-se 3 mL da solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), aqueceu-se a 100 °C por 5 min., resfriou-se e leu-se a absorbância a 540nm (MILLER, 1956). Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima que libera um μ mol de açúcares redutores totais por minuto nas condições de ensaio.

A atividade da lacase seguiu como descrito por Buswell *et al.* (1995), utilizando como substrato o 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazol-6-sulfônico (ABTS). A reação para um volume total de 3 mL continha 2,3 mL de citrato de sódio (0,1M, pH 5,0), 0,6 mL de extrato bruto e 0,1 mL de ABTS (1mM), acrescentado no momento da leitura no espectrofotômetro. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da banda de absorção em 420 nm, após 15 segundos (absortividade do ABTS oxidado = 36.000 M⁻¹.cm⁻¹). Após esta reação de oxidação, permaneceu no banho-maria a 37 °C por 10 min. Em seguida, fez-se

outra leitura da absorbância e a atividade da enzima foi calculada pela diferença entre a absorbância final e a absorbância inicial. O branco da reação continha todos os reagentes, exceto o extrato bruto que foi substituído pelo tampão citrato de sódio. Uma unidade de atividade de lacase foi definida como a quantidade de enzima que libera um μmol de produto por minuto nas condições de ensaio.

Para a quantificação de proteínas utilizou-se o método de Bradford (1976). O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

Preparação do reagente Coomassie-blue G-250:

- ✓ Dissolver 100 mg de Coomassie blue em 50 mL de etanol 95%;
- ✓ Adicionar 100 mL de H_3PO_4 85%;
- ✓ Completar para 1 L;
- ✓ Deixar overnight com agitação constante e filtrar,
- ✓ Concentrações finais: 0,01% de Coomassie, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol.

Preparo da curva padrão usando soro albumina bovina (BSA) como padrão na concentração 1mg.mL^{-1} em varias diluições (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Procedimento para obtenção da curva padrão de proteínas utilizando-se como padrão BSA (1 mg.mL^{-1})

Tubos	BSA(1mg.mL^{-1}) (mL)	Água (mL)	Coomassie (mL)	Blue G-250	μg Protéina
1	0,00	0,10	5,0		0
2	0,02	0,08	5,0		20
3	0,04	0,06	5,0		40
4	0,06	0,04	5,0		60
5	0,08	0,02	5,0		80
6	0,10	0,00	5,0		100

Para a leitura das amostras, adicionou-se em um tubo de ensaio, 100 μ L do extrato e 5 mL do reagente de Bradford. Incubou-se a temperatura ambiente por 15 minutos e mediu a Abs à 595nm. Através da equação da curva padrão determinou-se o teor de proteínas das amostras.

4.3.4 - Caracterização das atividades dos complexos de enzimas

As atividades de Celulase total, AVICELase, CMAase e β -glicosidase foram caracterizadas quanto ao pH e temperatura ótima, e também quanto à termoestabilidade das enzimas na temperatura de máxima atividade.

Seguiu-se os ensaios para as referidas enzimas, com variação do pH do tampão, ou da temperatura de reação.

O pH variou de 3 a 8. Os sistemas tampão usados foram: 50 mM de tampão de citrato (pH 3,0 - 6,0) e 50 mM de tampão fosfato (pH 6,0 - 8,0).

A temperatura de incubação para a medida da atividade da enzima variou de 30 a 80 °C.

Para estimar a termoestabilidade, o complexo enzimático ficou estocado nas temperaturas ótimas aparente de cada enzima, e depois se fez a medição da atividade da enzima até 48 horas de estocagem.

Foram utilizadas as seguintes temperaturas de incubação:

FPase - 60 °C para os extratos dos fungos PC e PLO06, 50 °C para TRAM01 e PLE04 e 70 °C para o PYC.

CMCase - 50 °C para os extratos dos fungos PC, PYC, TRAM01 e PLE04 e 60 °C para o PLO06.

AVICELase - 50 °C para todos os complexos multi-enzimas.

β -glicosidase - 40 °C para os extratos dos fungos PLE04 e PLO06, 50 °C para o PC, 60 °C para o TRAM01 e 70 °C para o PYC02.

4.3.5 - Sacarificação enzimática

Para o processo de sacarificação, a extração das enzimas foi conduzida de modo a se obter um extrato mais concentrado, sendo todos os extratos obtidos após 20 dias de incubação (substrato completamente colonizado), na proporção

de 1:6 (substrato:tampão), tampão citrato 50 mM, pH 4,8. Os extratos foram colocados em frascos de 2 mL, centrifugados (12 000 g) e congelados a -18 °C.

Novamente as atividades enzimáticas das celulasas foram medidas para o cálculo da carga de enzimas para a sacarificação.

A sacarificação foi realizada com as polpas obtidas de cada tipo de pré-tratamento e da palha de sorgo não-tratada. A metodologia foi baseada no protocolo LAP 008.

A concentração de material ligninocelulósico foi de 1% (300 mg de biomassa), colocadas em frasco com tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8, e ou o extrato bruto enzimático (Tabela 4.1), num volume final de 30 mL. Azida de sódio (0,1% p/v) foi utilizada para inibir o crescimento microbiológico durante a hidrólise enzimática.

Na Tabela 4.2 abaixo, estão os dados das condições iniciais do complexo multi-enzimático de cada fungo. O objetivo foi manter a carga de enzimas próxima entre os fungos para permitir uma comparação nas reações de sacarificação de cada tipo de materiais.

Tabela 4.2 - Condições dos extratos utilizadas na hidrólise da palha de sorgo forrageiro

Fungo	Celulase total (U.mL ⁻¹)	β-glicosidase (U.mL ⁻¹)	Extrato (mL)	Tampão (mL)
PC	0,12	0,11	20	10
PYC02	0,10	0,05	25	5
TRAM01	0,14	0,24	18	12
PLE04	0,07	0,03	30	0
PLO06	0,17	0,03	15	15

Na Tabela 4.3, está discriminado o poder de sacarificação para todos os fungos, ou seja, atividade de Celulase total por grama de celulose e biomassa. No protocolo LAP 008 sugere-se uma carga de enzimas na ordem de 25 FPU.g⁻¹. Apesar de não se ter uma carga de 25 U.g⁻¹ de Celulase total para todos os fungos, tem-se cargas de enzimas semelhantes entre todos os fungos para cada tipo de material a ser hidrolisado.

Tabela 4.3 – Carga de enzimas calculada pela atividade de Celulase total (FPU) por grama de celulose e por grama de biomassa

Biomassa	FPU.g⁻¹ de celulose	FPU.g⁻¹ de biomassa
<i>Pleurotus ostreatus</i> PLO06		
Palha (Sorgo nativo)	22,39	8,03
Polpa PT ácido	12,06	8,03
Polpa PT básico	9,14	8,03
Polpa PT ácido e Deslignificada	8,27	8,03
<i>Pycnoporus sanguineus</i> PYC02		
Palha (Sorgo nativo)	22,95	8,23
Polpa PT ácido	12,36	8,23
Polpa PT básico	9,37	8,23
Polpa PT ácido Deslignificada	8,48	8,23
<i>Pleurotus eryngii</i> PLE04		
Palha (Sorgo nativo)	20,07	7,20
Polpa PT ácido	10,81	7,20
Polpa PT básico	8,19	7,20
Polpa PT ácido e Deslignificada	7,41	7,20
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> PC		
Palha (Sorgo nativo)	22,39	8,03
Polpa PT ácido	12,06	8,03
Polpa PT básico	9,14	8,03
Polpa PT ácido e Deslignificada	8,27	8,03
<i>Trametes versicolor</i> TRAM01		
Palha (Sorgo nativo)	23,70	8,50
Polpa PT ácido	12,76	8,50
Polpa PT básico	9,67	8,50
Polpa PT ácido e Deslignificada	8,75	8,50

Os experimentos de sacarificação foram conduzidos em erlemeyer de 125 mL, em shaker (Tecnal – TE – 421) agitado a 120 rpm, à temperatura de 50 °C. Amostras de 0,5 mL foram retiradas a cada 6 horas até 24 horas, e depois de 12 em 12 horas até 72 horas, sendo que cada amostra foi aquecida a 100 °C por 5 minutos para inativação das enzimas, centrifugada e posteriormente, foi determinada a concentração de açúcares redutores e glicose. Para comparação, também realizou-se a sacarificação da polpa obtida de pré-tratamento ácido e deslignificada por enzimas comerciais. O complexo enzimático Multifect GC (GENENCOR) foi utilizado para hidrólise enzimática.

Os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos das empresas Sigma Chemicals ou Vetec Química, com pureza analítica (PA).

4.3.6 - Pré-tratamentos da palha de sorgo

As condições dos pré-tratamentos aplicadas para a transformação da palha de sorgo estão descritas na Tabela 4.4. Estas condições de pré-tratamento foram determinadas em ensaios anteriores.

Tabela 4.4 - Condições utilizadas nos pré-tratamentos da palha de sorgo

	Pré-tratamentos			
	Básico	Ácido	Ácido seguido de deslignificação	
Massa de palha seca (g) peso úmido	10	10	10	
Solução básica ou ácida (g.L⁻¹)	50	50	50 (H ₂ SO ₄)	50 (NaOH)
Volume solução básica ou ácida (mL)	150	150	150	150
Temperatura (°C)	120	120	120	120
Tempo (min.)	15	15	15	15

O processo ácido seguido por deslignificação teve as condições de tempo, concentração de base e temperatura mantidas constantes, 15 minutos, 50 g.L⁻¹ e 120 °C, respectivamente (Tabela 4.4).

Os pré-tratamentos foram realizados em autoclave (modelo AV 50, Marca MARCONI). Após cada tratamento, a mistura foi filtrada, separando-se o material em hidrolisado (filtrado) e a polpa (material retido). A polpa foi lavada com água destilada, até neutralização, observado pelo pH do líquido filtrado, medido em potenciômetro (Hanna pH 21).

A polpa foi colocada em placas de Petri para secagem a temperatura ambiente e depois de seca, a polpa embalada foi estocada em geladeira. Determinaram-se os teores finais de umidade das polpas e da palha de sorgo, para a correção final em peso seco.

4.3.7 - Análises estatísticas

Foi realizada comparação entre os níveis (percentuais) de sacarificação enzimática da polpa ácido/deslignificada pelos extratos enzimáticos dos fungos e pela enzima comercial.

A significância entre os procedimentos foi determinada usando análise de variância (ANOVA) ao nível de $P < 0,05$ e teste de média Tukey foi aplicado, utilizando o software SAEG (UFV, 2007).

4.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 - Produção do complexo de celulases por fermentação no estado sólido

A colonização total para cada fungo variou de 15 a 20 dias após a inoculação. Como pode ser observada na Figura 4.2, toda a palha ficou coberta por micélios com predominância da coloração branca.

Dos materiais colonizados (Figura 4.2) foram realizada a extração das enzimas aos 20, 30 e 50 dias, sendo e a medida das atividades de Celulase total (FPase), CMCase e AVICELase (Figura 4.3).



Figura 4.2 – Fermentação em estado sólido da base de palha de sorgo forrageiro por fungos da podridão branca. A: *P. eryngii* **PLE04**; B: *T. versicolor* **TRAM01**, C: *P. chrysosporium* **PC**, D: *P.s sanguineus* **PYC02**; E: *P. ostreatus* **PLO06**.

Na avaliação das atividades enzimáticas durante os dias de fermentação (Figura 4.3), não houve um comportamento que permitiu relacionar maior atividade com o tempo de fermentação para todas as enzimas. O trabalho foi conduzido com a padronização da extração das enzimas aos 20 dias após a inoculação para todos os fungos.

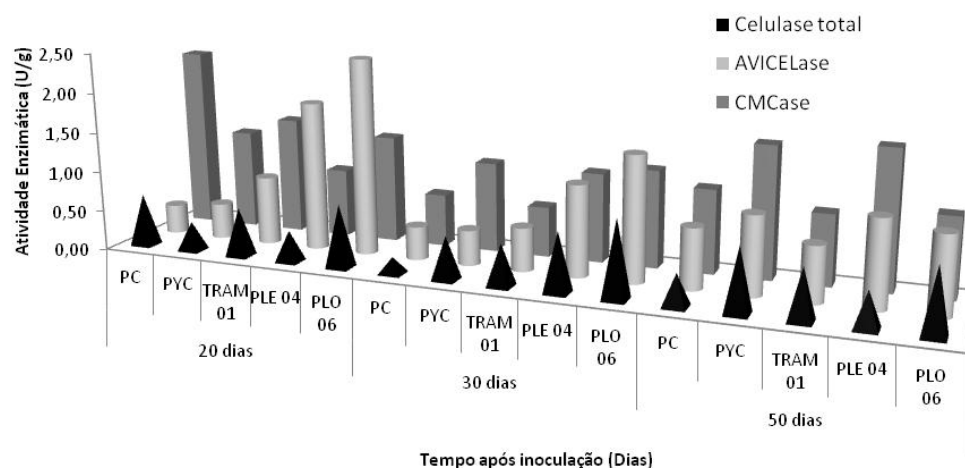


Figura 4.3 – Atividades das enzimas FPase, CMCase e AVICELase (U/g de massa seca) dos fungos de podridão branca, *P. chrysosporium* PC, *P. sanguineus* PYC02, *T. versicolor* TRAM01, *P. eryngii* PLE04 e *P. ostreatus* PLO06, durante a fermentação em estado sólido da palha do sorgo forrageiro. Médias de 2 repetições.

4.4.2 - Ensaios enzimáticos

As atividades de Celulase total, CMCase, AVICELase e β -glicosidase, xilanase e lacase dos fungos de podridão branca, depois de 20 dias de fermentação da palha do sorgo forrageiro com 50% de umidade, à temperatura de 28 °C, são mostradas na Tabela 4.5

Tabela 4.5 – Atividades enzimáticas (U.g⁻¹ ms) dos extratos da palha de sorgo, fermentada fungos da podridão branca, após 20 dias, com umidade de 60% e incubado a 28 °C. Médias e desvios padrões de 2 repetições.

Fungo	Celulase total (U.g ⁻¹)	AVICELase (U.g ⁻¹)	CMCase (U.g ⁻¹)	β -glicosidase (U.g ⁻¹)	Xilanase (U.g ⁻¹)	Lacase (U.g ⁻¹)
<i>P. sanguineus</i>	0,80	0,88	2,03	0,38	8,43	14,33
PYC02	$\pm 0,05$	$\pm 0,08$	$\pm 0,18$	$\pm 0,03$	$\pm 0,00$	$\pm 0,57$
<i>P. ostreatus</i>	1,32	4,12	2,25	0,18	1,33	5,65
PLO06	$\pm 0,03$	$\pm 0,02$	$\pm 0,07$	$\pm 0,01$	$\pm 0,00$	$\pm 0,42$
<i>P. eryngii</i>	0,65	3,12	1,43	0,23	1,80	6,58
PLE04	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,05$	$\pm 0,03$	$\pm 0,10$	$\pm 0,68$
<i>P. chrysosporium</i>	1,13	0,65	4,03	1,08	2,37	0,70
PC	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$	$\pm 0,10$	$\pm 0,043$	$\pm 0,15$	$\pm 0,08$
<i>T. versicolor</i>	1,02	1,43	2,25	1,88	8,03	9,87
TRAM01	$\pm 0,05$	$\pm 0,07$	$\pm 0,10$	$\pm 0,052$	$\pm 0,01$	$\pm 0,53$

A fermentação em estado sólido da palha de sorgo foi capaz de gerar o complexo multi celulases, apresentando variações de valores para cada fungo.

Aos 20 dias de incubação, a maior atividade de celulose total (FPase) foi de $1,32 \text{ U.g}^{-1}$ (m.s) na cultura de *P. ostreatus* PLO06. Os demais fungos produziram de 0,65 a $1,13 \text{ U.g}^{-1}$ (m.s) de FPase (Tabela 4.5).

Singhania *et al.* (2007) ao utilizar *T. reesei* RUT C30 em farelo de trigo, obtiveram atividade de Celulase total de $0,17 \text{ U.g}^{-1}$ (m.s) de substrato com 5 dias de cultivo, e Zúñiga (2010), na FES de bagaço de cana com o fungo *A. niger*, alcançou atividade de FPase de $0,25 \text{ U.g}^{-1}$, valores abaixo ao encontrado do presente trabalho.

Entretanto, outros trabalhos obtiveram valores de FPase bem superiores aos obtidos neste trabalho. Em pesquisa realizada por Elisashvili *et al.* (2008), o fungo *P. ostreatus* atingiu valores próximo de $12,0 \text{ U.g}^{-1}$ de FPase na fermentação de palha de trigo enriquecida com extrato de levedura. Ng *et al.* (2010) testaram vários meios como palha de arroz, farelo de arroz e bagaço de cana, para a indução de FPase por *Penicillium citrinum* YS40-5. O meio que mais induziu a FPase foi a palha de arroz atingindo valores de $4,8 \text{ U.g}^{-1}$. Após 15 dias de incubação de *Pleurotus sajor caju* em palha de arroz, Bisaria *et al.* (1997) encontraram níveis de atividade de Celulase total de $3,7 \text{ U.g}^{-1}$.

No presente trabalho, não foi realizada nenhum enriquecimento ou pré-tratamento do substrato, somente a esterilização do substrato, controle de temperatura de incubação (28°C) e umidade (60%). O baixo rendimento em FPase pode estar associado ao substrato insolúvel (palha) de origem ligninocelulósica e à falta de adição de nitrogênio para enriquecimento do meio.

A maior atividade de CMCase (endoglucanase) foi alcançada nas culturas de *P. chrysosporium* PC atingindo valores de $4,03 \text{ U.g}^{-1}$, após os 20 dias de incubação. Mayrink (2010), na produção de celulases utilizando fungos filamentosos, obteve um valor menor, sendo $2,50 \text{ U.g}^{-1}$ como melhor resultado com 23 dias de fermentação em bagaço de cana-de-açúcar.

Outros trabalhos relataram maiores produções dessa enzima, como em Zúñiga (2010), que na FES de bagaço de cana, com o fungo *A. niger* alcançou a produtividade enzimática de CMCase de 10 U.g^{-1} (m.s), ou em Panagiotou *et al.*

(2003), que com o fungo *Fusarium oxysporum* em FES de resíduos de milho obteve valores de 50,0 a 304,0 U.g⁻¹ para a CMCase, durante a otimização do meio de fermentação.

Em pesquisa realizada por Elisashvili (2008), algumas linhagens de *P. ostreatus* exibiram atividades de CMCase superiores, entre 6,25 e 325 U.g⁻¹, na FES de folhas de árvores e palha de trigo, os quais foram enriquecidos com extratos de levedura.

A atividade enzimática de CMCase com o menor valor foi a do fungo *P. eryngii* PLE04 com apenas 1,43 U.g⁻¹ (m.s).

Para a enzima AVICELase (exoglucanase) o maior valor foi observado nas culturas de *P. ostreatus* PLO06, com cerca de 4,12 U.g⁻¹ seguido por outro fungo do gênero, o *P. eryngii* PLE04 com valores de 3,12 U.g⁻¹ de substrato seco. Esses valores encontrados foram significativos, dados que o fungo *F. oxysporum* apresentou atividade de AVICELase de 4,1 U.g⁻¹, em FES de resíduos de milho otimizada pela adição de fontes de nitrogênio, nível de umidade inicial, temperatura de crescimento e pH inicial da cultura. Com o substrato para FES com mesmo nível de umidade deste trabalho e também sem enriquecimento com nitrogênio, a atividade dessa enzima foi de cerca de 2,0 U.g⁻¹ (PANAGIOTOU *et al.*, 2003).

A atividade de β -glicosidase apresentou o maior valor nas culturas do fungo *T. versicolor* TRAM01 com 1,88 U.g⁻¹ (ms). Mayrink (2010), com o isolado de *Trichoderma sp.* T03 após 28 dias de cultivo em bagaço de cana relatou a produção de β -glicosidase com máxima atividade de 5,20 U.g⁻¹ (ms), valor superior ao encontrado neste trabalho. No entanto, após 15 dias de incubação de *Pleurotus sajor caju* em palha de arroz, Bisaria *et al.* (1997) encontram níveis de atividade de β -glicosidase de 0,6 U.g⁻¹, atividade maior do que as β -glicosidasas dos fungos do gênero *Pleurotus* avaliados neste trabalho, que foi de apenas 0,18 U.g⁻¹ (ms) para o *P. ostreatus* PLO06 e de 0,23 U.g⁻¹ (ms) para o *P. eryngii* PLE04. No entanto, valor abaixo do fungo *T. versicolor* TRAM01 com 1,88 U.g⁻¹ (ms).

Panagiotou *et al.* (2003), com fungo *F. oxysporum* obtiveram atividade máxima de β -glicosidase de apenas 0,14 U.g⁻¹, em FES de resíduos de milho

otimizada pela adição de fontes de nitrogênio, nível de umidade inicial, temperatura de crescimento e pH inicial da cultura. Valor abaixo dos obtidos por todos os fungos avaliados neste trabalho.

A xilanase foi induzida em quantidades significativas em todos os fungos estudados. Sendo que a enzima hidrolítica apresentou o maior valor, $8,43 \text{ U.g}^{-1}$ (m.s), pelo fungo *P. sanguineus* PYC02. Outros trabalhos relataram valores muito superiores de atividade dessa enzima, como Sonia *et al.* (2005), trabalhando também com a palha do sorgo em FES, conseguiu atingir atividades de xilanase pelo fungo *T. lanuginosus* D2W3 da ordem de $10145,00 \text{ U.g}^{-1}$ de substrato seco. O fungo *F. oxysporum* alcançou a atividade de xilanase de $1840,0 \text{ U.g}^{-1}$ em FES, de resíduos de milho otimizada pela adição de fontes de nitrogênio, nível de umidade inicial, a temperatura de crescimento e pH inicial da cultura (PANAGIOTOU *et al.*, 2003). Um isolado de *Trichoderma sp.* T02 em cultivo no bagaço de cana também alcançou valor superior aos encontrados neste trabalho, com o pico de atividade de xilanase de $30,0 \text{ U.g}^{-1}$ (m.s) (MAYRINK, 2010).

Na atividade da enzima lacase o destaque novamente foi o fungo *P. sanguineus* PYC02 com o valor de $14,33 \text{ U.g}^{-1}$ (ms). Entre os basidiomicetos, os membros do gênero *Pycnoporus* têm-se mostrado como produtores de várias enzimas de aplicações industriais como xilanase e glicosidase (ESPOSITO *et al.*, 1993). Este gênero mostra-se bastante promissor devido à produção de lacase como a principal enzima lignolítica (EGGERT *et al.*, 1996).

Há uma tendência crescente do emprego da lacase em processos biotecnológicos, e *P. sanguineus* já foi utilizado na descoloração de efluente Kraft (DURAN *et al.*, 2002; ESPOSITO *et al.*, 1993) e na degradação de diferentes corantes (POINTING e VRIJMOED, 2000).

No entanto, o valor obtido pelo fungo *P. sanguineus* PYC02 foi abaixo do encontrado por outras linhagens do *P. sanguineus*, como no trabalho de Vikineswary *et al.* (2006), onde a produção de lacase em FES de resíduos agroindustriais alcançou o máximo de $48,7 \text{ U.g}^{-1}$ (ms).

Em relação a outros fungos, Iandolo *et al.* (2011) conseguiram nível máximo de produção de atividade de lacase de 15 U.g^{-1} (m.s) e de 35 U.g^{-1} (m.s)

com linhagens de *P. ostreatus* e *T. versicolor*, respectivamente, por fermentação em substrato sólido de bagaço de tomate. Estes valores encontrados também foram superiores aos obtidos neste trabalho.

Entretanto, em outros trabalhos, algumas linhagens de *P. ostreatus* exibiram em FES de folhas de árvores e palha de trigo, substratos enriquecidos com extratos de levedura, atividades de lacase entre 1,75 e 4,25 U.g⁻¹(ms) (ELISASHVILI, 2008). Assim, o valor obtido de 5,65 U.g⁻¹ (m.s) neste trabalho para *P. ostreatus* PLO06 é relevante, principalmente, devido ao fato de que não houve enriquecimento nutricional. Outro fungo *P. ostreatus* em FES de folha de banana apresentou no 20º dia a máxima atividade de lacase de 10,94 U.g⁻¹ (m.s) (REDDY *et al.*, 2003), abaixo da atividade exibida pelo fungo *P. sanguineus* PYC02.

A concentração de proteínas dos extratos obtidos de cada fermentação é mostrada na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Teor de proteína extracelular obtido em FES de fungos da podridão branca cultivados na palha de sorgo

Fungo	mg.mL⁻¹ de extrato	mg.g⁻¹ de substrato colonizado (massa seca)
<i>Pycnoporus sanguineus</i> PYC02	0,09 ±0,01	1,33 ±0,13
<i>Pleurotus ostreatus</i> PLO06	0,11 ±0,01	1,67 ±0,14
<i>Pleurotus eryngii</i> PLE04	0,15 ±0,01	2,30 ±0,20
<i>Phanerochaete chrysosorium</i> PC	0,13 ±0,01	1,96 ±0,10
<i>Trametes versicolor</i> TRAM01	0,11 ±0,01	1,65 ±0,12

Os valores de proteína extracelular dos fungos testados neste trabalho foram menores que os relatados em outros trabalhos, possivelmente devido ao não enriquecimento com nitrogênio e ainda ao fato da biomassa utilizada ser de baixo nível proteico.

Fungos *P. ostreatus* e *P. sajor-caju* em FES de folha de banana apresentaram no 25º dia de incubação conteúdo de proteína extracelular de cerca de 35 mg.mL⁻¹ no extrato bruto (REDDY *et al.*, 2003), bem superior aos obtidos para todos os fungos deste trabalho.

O extrato produzido por *Burkholderia cepacia* cultivada em meio sólido, com farelo de semente de girassol como substrato apresentou 0,55 mg.mL⁻¹ na concentração de proteínas (FERNANDES, 2007) e o extrato do fungo *Lentinus tigrinu* em FES da palha de trigo alcançou cerca de 0,7 mg.g⁻¹ de proteínas no extrato bruto em 110 dias (LECHER e PAPINUTTI, 2006).

Somente em Siqueira (2010), na fermentação de diversos resíduos ligninocelulósicos por fungos filamentosos, obteve-se no extrato enzimático concentração de proteína entre 0,016 a 0,035 mg.mL⁻¹, os valores menores que os obtidos neste trabalho.

4.4.3 - Caracterização das atividades celulolíticas dos extratos de culturas de fungos da podridão branca em palha de sorgo

4.4.3.1 - Celulase total (FPase)

Nas atividades aparentes de Celulase total dos complexos multi-celulases em relação ao pH (Figura 4.4), a Celulase total do fungo TRAM01 apresentou a máxima atividade aparente em pH 4. Os fungos PYC02 e PC apresentaram pH ótimo aparente de 5, com elevada sensibilidade à variação deste parâmetro. A mudança de uma unidade no pH acarreta uma redução na atividade cerca de 25%.

Os fungos do gênero *Pleurotus* apresentaram o pH 7 como ótimo aparente, no entanto, a atividade da Celulase total do *P. ostreatus* PLO06 mostrou valores relativos acima de 50%, na faixa de pH 3 a 8.

Outros trabalhos na caracterização de FPases mostraram resultados semelhantes. A atividade de FPase apresentou melhor resultado em pH 5,0 no cultivo de *A. oryzae* crescido em engaço de bananeira, porém, a amplitude de faixa de pH para essas enzimas foi estendida entre 3,5 e 8,0, chegando a mais de 70% da atividade máxima observada (SIGUEIRA, 2010). Os estudos de Dutta *et al.* (2008) mostraram máxima atividade FPase em pH 6,5 para o *Penicillium citrinum*, próxima ao valor encontrado para os fungos do gênero *Pleurotus* utilizados neste trabalho.

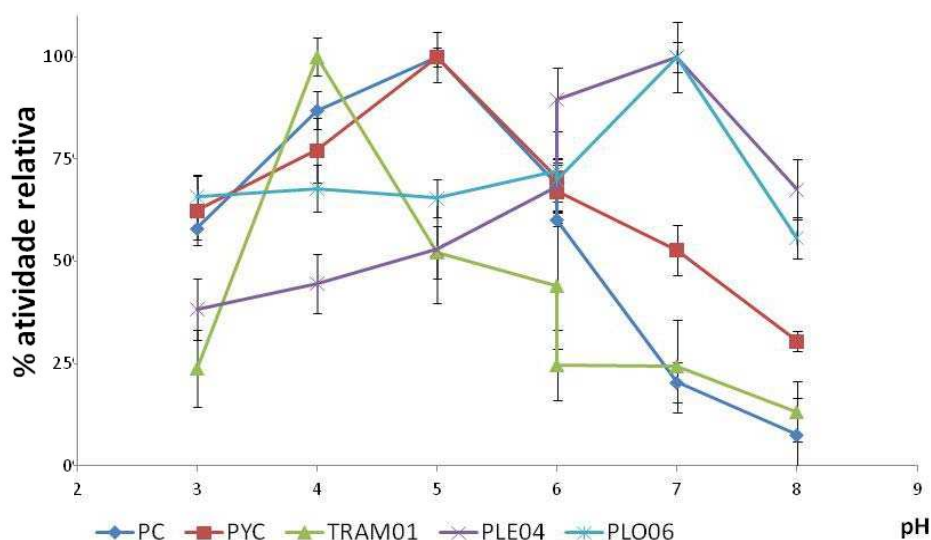


Figura 4.4 – Efeito do pH sobre as atividades aparente de Celulase total (FPase), dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* **PC**, *Pycnoporus sanguineus* **PYC02**, *Trametes versicolor* **TRAM01**, *Pleurotus eryngii* **PLE04** e *Pleurotus ostreatus* **PLO06**, obtidas por FES da palha de sorgo forrageiro.

O fungo *Aspergillus niger* LTB produziu FPase com máxima atividade em pH 4,0 (RODRIGUES, 2009), igualmente ao fungo TRAM01.

Almeida (2009) observou atividades de celulasas do fungo *Acremonium* sp. em cultura submersa utilizando bagaço de cana e obteve maior atividade de FPase em pH 6,0 a 55 °C, um valor diferente do observado para todos fungos avaliados neste trabalho (Figura 4.6).

Com relação aos efeito da temperatura nas atividades FPase dos fungos (Figura 4.5), o fungo *P. sanguineus* PYC02 registrou máxima atividade aparente de Celulase total na temperatura de 70 °C, sendo que a 80 °C a atividade foi mantida em cerca de 60%. Uma linhagem de *Trichoderma* C012 obteve resultado semelhante, onde manteve acima de 50% de sua atividade máxima a 75 °C (MAIRINK, 2010).

Os fungos PLO06 e PC apresentaram temperatura ótima aparente de FPase de 60 °C. Os demais apresentaram 50 °C como temperatura de máxima atividade aparente. Sendo que a atividade de FPase do fungo *A. oryzae* crescido em FES de engaço de bananeira, o resultado mais expressivo foi no intervalo de

temperatura 45 °C a 55 °C (SIGUEIRA, 2010), o que foi verificado para os fungos TRAM01 e PLE04.

Outros autores relataram resultados semelhantes, Castellanos *et al.* (1995), observaram que a máxima atividade de FPase, produzida por *Penicillium sp.*, variou entre 50 e 55 °C, enquanto Dutta *et al.* (2008) encontraram máxima atividade de FPase em 60 °C de FPase produzidas por *P. citrinum*.

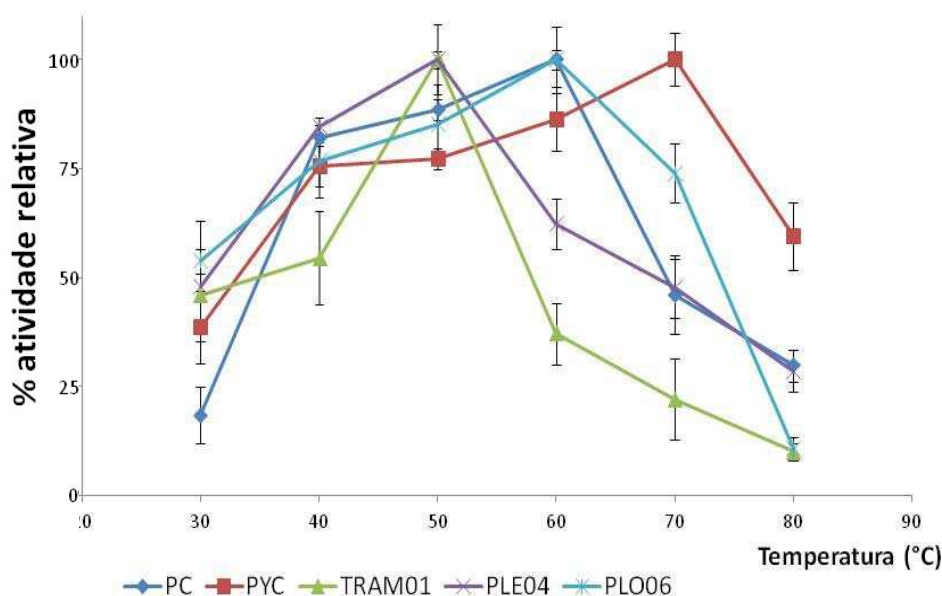


Figura 4.5 – Efeito da temperatura sobre as atividades aparente de Celulase total (FPase), dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* **PC**, *Pycnoporus sanguineus* **PYC02**, *Trametes versicolor* **TRAM01**, *Pleurotus eryngii* **PLE04** e *Pleurotus ostreatus* **PLO06**, obtidas por FES da palha de sorgo forrageiro.

As FPases presentes em algumas linhagens de *Trichoderma ssp.* exibiram máxima atividade a 40 °C (MAIRINK, 2010), demonstrando valores abaixo dos resultados obtidos neste trabalho.

Em geral, a termoestabilidade (Figura 4.6) da Celulase total para todos os fungos manteve-se por 48 horas. Com especial destaque para a termoestabilidade da atividade de Celulase total do fungo *P. sanguineus* PYC02 que após 48 horas, a 70 °C, manteve atividade residual acima de 30%.

O fungo PLE04 apresentou maior declinação na atividade de FPase (Figura 4.6). Em menos de 6 horas sua atividade diminuiu para cerca de 40%, permanecendo próxima aos 20% até 48 horas.

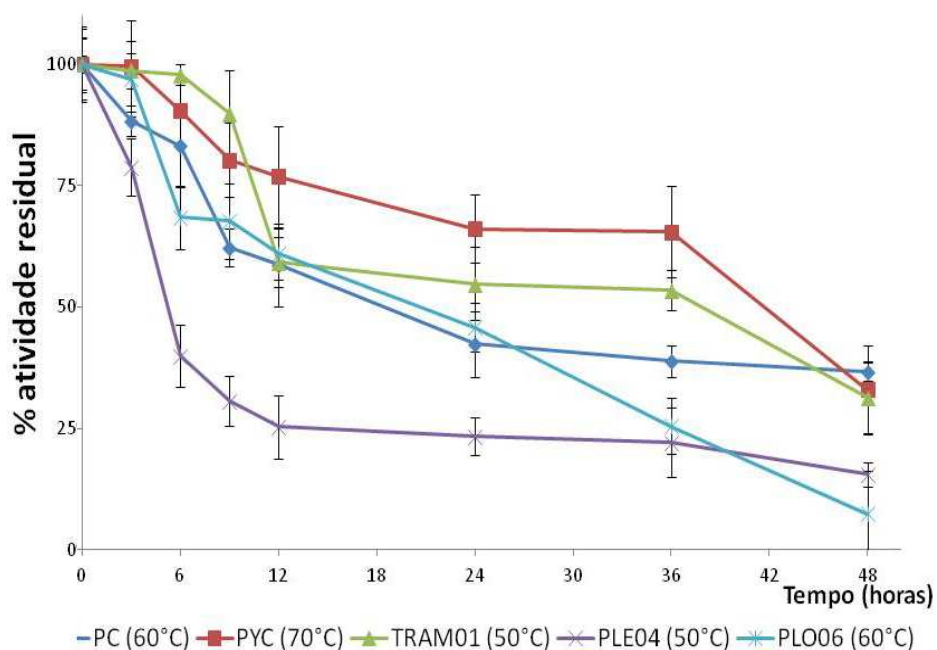


Figura 4.6 – Termostabilidades das atividades Celulase total (FPase), dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* **PC**, *Pycnoporus sanguineus* **PYC02**, *Trametes versicolor* **TRAM01**, *Pleurotus eryngii* **PLE04** e *Pleurotus ostreatus* **PLO06**, obtidas por FES da palha de sorgo forrageiro. Entre parênteses têm-se as temperaturas em que cada extrato de fungo foi incubado (temperatura ótima aparente de FPase).

Outros trabalhos relataram enzimas menos termostáveis. A FPase de uma linhagem de *Aspergillus* manteve aproximadamente 76% da sua atividade após ser pré-incubada por 5 horas a 50 °C. Entretanto, após este tempo, a atividade foi caindo gradativamente até 8 horas de incubação, quando ela perdeu totalmente sua atividade (RODRIGUES, 2009). A FPase produzida por *Acremonium* sp. EA0810, cultivado com bagaço de cana, perdeu 70% da sua atividade quando pré-incubada por 30 minutos a 55 °C (ALMEIDA, 2009). Dutta *et al.* (2008) reportaram a perda de 70% da atividade inicial de uma FPase de *Penicillium citrinum* após ser pré-incubada por 30 minutos a 55 °C.

Nesse trabalho, os extratos obtidos da FES da palha do sorgo pelos fungos da podridão branca mostraram, em geral, boa termostabilidade.

4.4.3.2 - Endoglucanase (CMCase)

As atividades da CMCase dos fungos PYC02, TRAM01 e PC apresentaram pH ótimo aparente de 4 e ainda apresentaram atividades acima de 70% no pH 3 (Figura 4.7).

Gao *et al.* (2008) obtiveram em FES de resíduos de milho pelo *Aspergillus terreus* M11, endoglucanase com pH ótimo de 2,0, a qual mostrou estabilidade notável entre pH 2 e 5.

As endoglucanases presentes em extratos de linhagens de *Trichoderma spp.* mostraram alta atividade na faixa de pH 3,5-5,5, mantendo acima de 80% de sua máxima atividade. Maior atividade de endoglucanase nesses extratos foi detectada em pH 4,5 (MAYRINK, 2010).

O caráter ácido dessa enzima foi relatado por Dutta *et al.* (2008), Gao *et al.* (2008) e Lee *et al.* (2010).

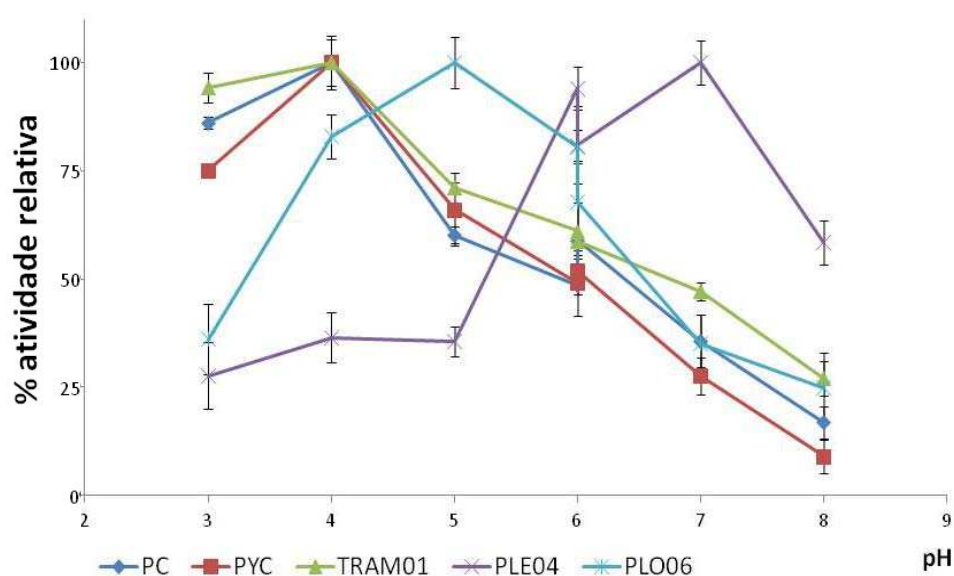


Figura 4.7 – Efeito do pH nas atividades das endoglucanases (CMCase) dos fungos *P. chrysosporium* PC, *P. sanguineus* PYC02, *T. versicolor* TRAM01, *P. eryngii* PLE04 e *P. ostreatus* PLO06, obtidas por FES da palha de sorgo forrageiro.

Segundo Khalil (2002), *P. chrysosporium* BKM-F-1767 crescido em bagaço de cana-de-açúcar (1%), apresentou pH ótimo para CMCase, em torno de 4,5, porém, mostrou-se, na faixa de pH entre 4,0 e 5,0, mais de 85% da atividade

enzimática. Resultado muito semelhante ao fungo *P. chrysosorium* PC avaliado neste trabalho.

A endoglucanase do fungo *Lentinus tigrinu* cultivado em palha de trigo apresentou como pH ótimo aparente de 3,5 (LECHER e PAPINUTTI, 2006). As CMCase obtidas no cultivo de *A. oryzae* em FES de engaço de bananeira, tiveram atividades expressivas na faixa ácida, tendo em pH 4,5 o seu melhor resultado (SIGUEIRA, 2010).

A atividade de CMCase do fungo PLE04 apresentou pH ótimo aparente neutro. Schulein (1997) avaliando o perfil de atividade de cinco enzimas endoglucanases provenientes do fungo *Humicola insolens*, em relação ao pH, encontrou atividades ótimas entre o pH 7,0 e 8,5. Jan e Chen (2003) obtiveram endoglucanase de *Streptomyces* T3-1 com pH ótimo igual a 7,0.

As atividades aparentes das endoglucanases dos extratos fúngicos em relação à temperatura na Figura 4.8, as endoglucanases da maioria dos fungos apresentaram máxima atividade aparente a 50 °C, exceto o PLE06, com temperatura ótima aparente a 60 °C. Esses valores são semelhantes aos relatados em vários trabalhos que caracterizaram essa enzima, seja produzida por FES ou Fsm.

Schrempf e Walter (1995) citaram uma endoglucanase de *Streptomyces reticuli* com temperatura ótima de 55 °C. Lima *et al.* (2005) encontraram temperatura ótima variando entre 50 e 60 °C para endoglucanase produzida por *S. drozdowiczii*. Em Silva e Gouveia (2008), linhagens de *Streptomyces* com a temperatura ótima de 60 °C foi observada. Também foi possível notar que a 70 °C as enzimas destes fungos ainda apresentavam atividade residual de, aproximadamente, 30% (UFPEDA SC08) e 50% (UFPEDA SC21).

Algumas linhagens de *Trichoderma spp* apresentaram as endoglucanases com atividades máximas acima de 50 °C (MAYRINK, 2010).

A máxima atividade de endoglucanase de *Trichoderma reesei* foi detectada a 60 °C (BUSTO *et al.*, 1996), enquanto endoglucanases produzidas por fungos do gênero *Penicillium* mostraram atividades máximas a 60 e 70 °C (Dutta *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010).

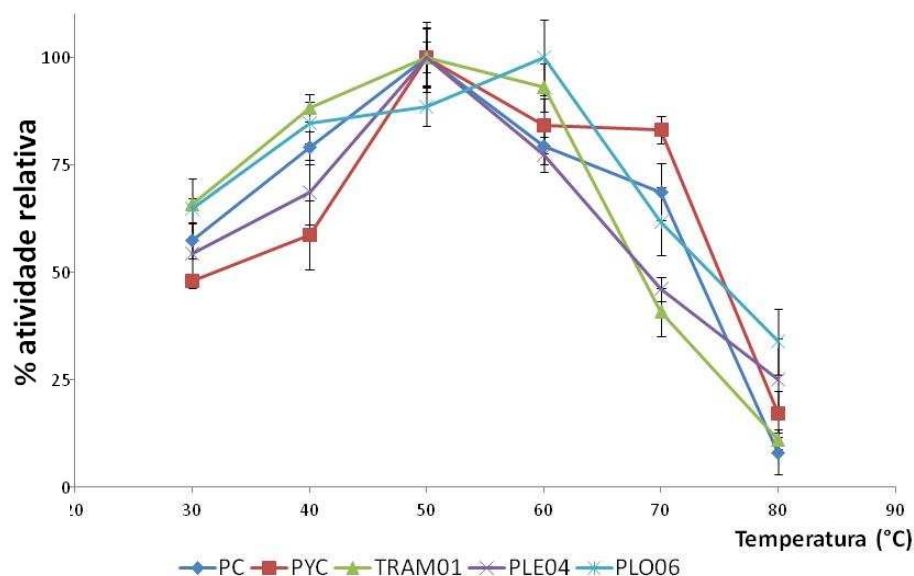


Figura 4.8 – Efeito da temperatura nas atividades das endoglucanases (CMCase) dos fungos *P. chrysosporium* **PC**, *P. sanguineus* **PYC02**, *T. versicolor* **TRAM01**, *P. eryngii* **PLE04** e *P. ostreatus* **PLO06**, obtidas por FES da palha de sorgo forrageiro.

Os extratos brutos de *Aspergillus* crescidos em diferentes fontes de carbono ligninocelulósicas pré-tratadas nas condições de FES apresentaram CMCases com temperatura ótima das atividades enzimáticas na faixa entre 40 °C e 60 °C (SIGUEIRA, 2010).

O fungo *Thermoascus aurantiacus* em FES com diferentes resíduos agrícolas apresentou pH e temperatura ótimos de 5,0 e 60 °C, respectivamente, para a atividade de CMCase (SILVA *et al.*, 2005).

Khalil (2002), em trabalho com *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767, crescido em bagaço de cana-de-açúcar (1%), observou as melhores atividades de CMCase na faixa de temperatura entre 55 °C e 70 °C. Valor acima do obtido da linhagem de *P. chrysosporium* PC avaliada.

Outros trabalhos obtiveram CMCases com atividade ótima acima de 60 °C. Em Gao *et al.* (2008), na produção de celulasas extracelulares por um fungo isolado, o *Aspergillus terreus* M11, na fermentação em estado sólido (FES) em resíduos de milho, a atividade de endoglucanase apresentou máximo a 70 °C. Bukhtjarov *et al.* (2004) relataram que o fungo *Chrysosporium lucknowense* apresentou melhores resultados de endoglucanase na faixa entre 60 °C e 70 °C.

Com relação à termoestabilidade da endoglucanase dos fungos avaliados (Figura 4.9), destaque para a atividade CMCase do fungo TRAM01, que manteve atividade acima de 50% depois de 48 h incubado a 50 °C. O fungo PYC também mostrou resultado semelhante até às 36 h de incubação a 50 °C, caindo para cerca de 40% de atividade com 48 h.

Os fungos PLE04 e PLO06, apesar de manter cerca de 50% de atividade da endoglucanase até 24 h de incubação a 50 °C e 60 °C, respectivamente, tiveram suas atividades zeradas em 48 h.

Rodrigues (2010) relata que a endoglucanase produzida pelo *Aspergillus niger* LTB foi muito estável em suas temperaturas ótimas, apresentando 68% de atividade residual após 24 horas de incubação a 60 °C. A endoglucanase reteve aproximadamente 90% da sua atividade inicial após ser incubada por 15 h. Nenhuma das CMCases avaliadas neste trabalho apresentou esse valor até 15 h, no entanto, após 48 h as CMCases do PC, PYC e TRAM continuavam com cerca de 50% da atividade inicial.

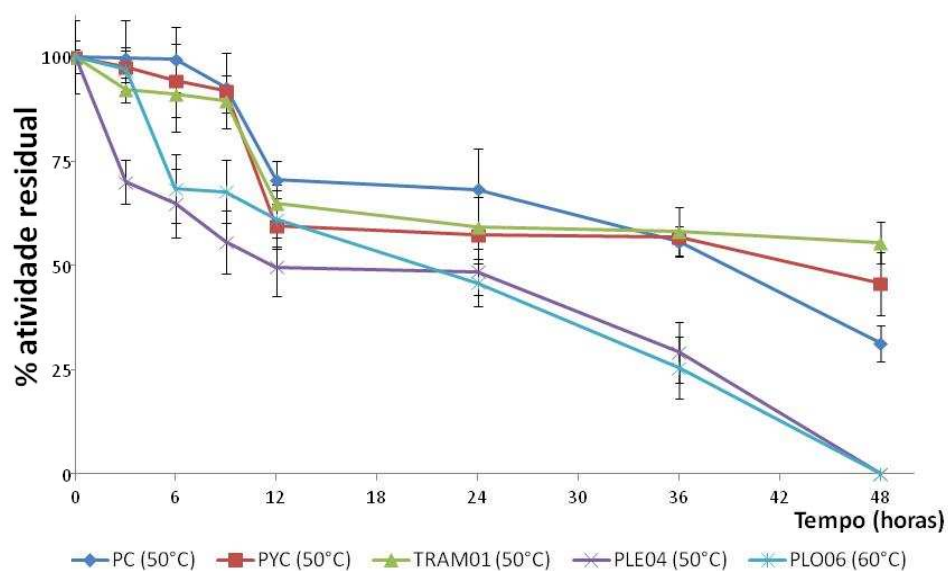


Figura 4.9 – Termoestabilidade das atividades das endoglucanases (CMCase) dos fungos *P. chrysosporium* **PC**, *P. sanguineus* **PYC02**, *T. versicolor* **TRAM01**, *P. eryngii* **PLE04** e *P. ostreatus* **PLO06**, obtidas por FES da palha de sorgo forrageiro. Entre parênteses têm-se as temperaturas em que cada extrato de fungo foi incubado (temperatura ótima aparente da CMCase).

Na avaliação de algumas propriedades de endoglucanases de *Streptomyces*, cultivado em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar, as mesmas foram capazes de reter aproximadamente 60% e 36% de atividade residual a 60 °C, durante 60 minutos, respectivamente (SILVA e GOUVEIA, 2008), muito pouco termoestável.

Nos estudos de Gao *et al.* (2008), a endoglucanase obtida a partir de *Aspergillus terreus* M11, cultivado em fermentação em estado sólido sobre sabugo de milho, reteve 65% da sua atividade inicial após ser incubada a 70 °C por 6 horas, e o fungo *L. tigrinu* cultivado em palha de trigo apresentou cerca de 73% de atividade residual da enzima endoglucanase depois de incubada por 42 h a 40 °C (LECHER e PAPINUTTI, 2006). Resultados semelhantes aos obtidos para a maioria das endoglucanases produzidas neste trabalho (Figura 4.9).

4.4.3.3 Exoglucanase (AVICELase)

Para todos os fungos, as atividades da enzima exoglucanase apresentaram o pH ótimo aparente de 6 (Figura 4.10).

Em outro trabalho as AVICELases produzidas em FES pelos fungos *A. terreus* e *A. oryzae* apresentaram melhores resultados de atividade enzimática na faixa de pH neutro. E a atividade da enzima exoglucanase obtida do cultivo de *A. oryzae* em bagaço apresentou valor máximo no pH 6,0 (SIGUEIRA, 2010).

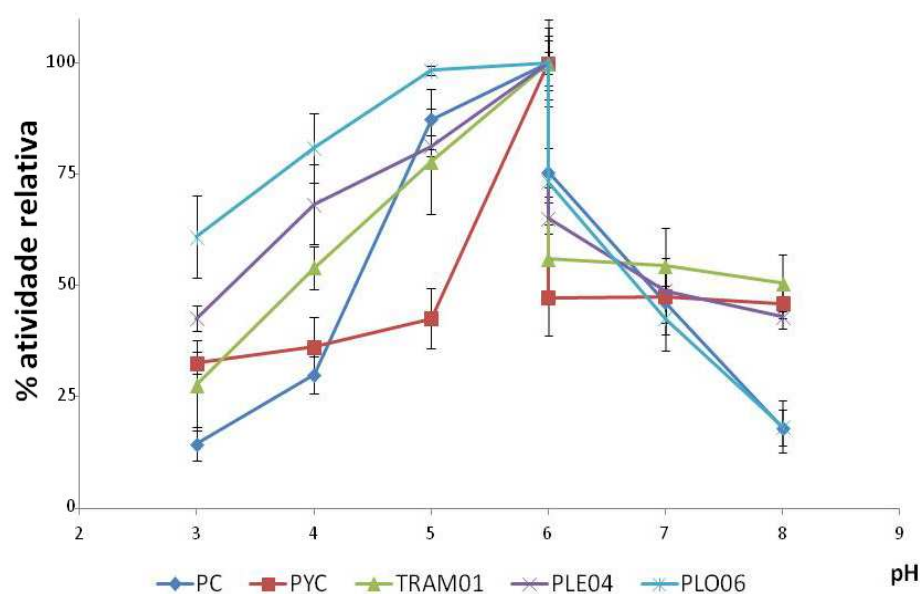


Figura 4.10 – Efeito do pH nas atividades das exoglucanases (AVICELase) dos fungos *P. chrysosporium* **PC**, *P. sanguineus* **PYC02**, *T. versicolor* **TRAM01**, *P. eryngii* **PLE04** e *P. ostreatus* **PLO06**, obtidas por FES da palha de sorgo forrageiro.

Comportamento semelhante ao ocorrido com o pH entre os fungos para a atividade da AVICELase, foi observado para a temperatura ótima aparente, com o valor de 50 °C para todos (Figura 4.11).

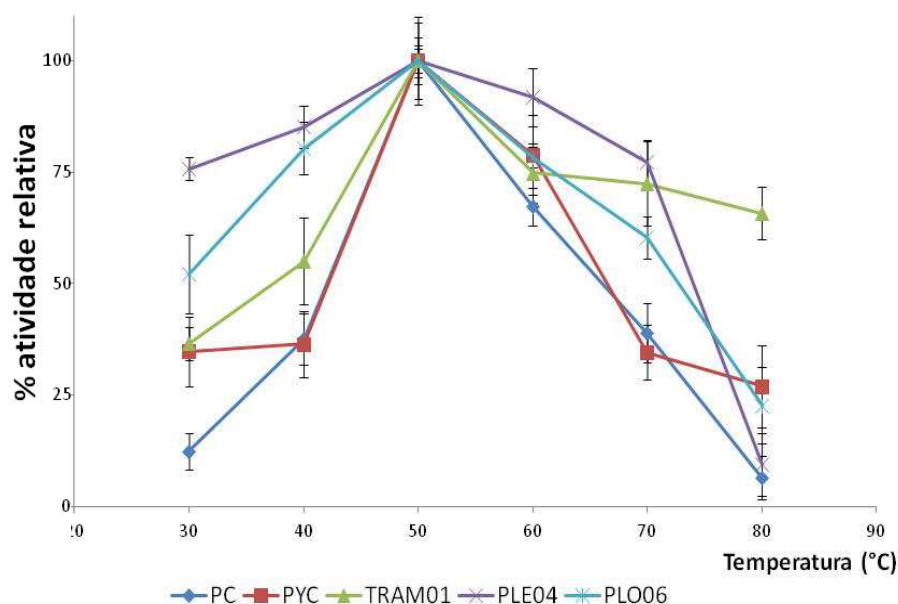


Figura 4.11 – Efeito da temperatura nas atividades das exoglucanases (AVICELase) dos fungos *P. chrysosporium* **PC**, *P. sanguineus* **PYC02**, *T. versicolor* **TRAM01**, *P. eryngii* **PLE04** e *P. ostreatus* **PLO06**, obtidas por FES da palha de sorgo forrageiro.

A atividade de AVICELase do *T. versicolor* TRAM01 ainda manteve atividade residual de 60% a temperatura de 80 °C. E o extrato do *P.eryngii* PLE04 apresentou cerca de 80% da atividade de AVICELase a 70 °C.

Com relação à termoestabilidade das enzimas exoglucanases (Figura 4.12). A termoestabilidade das exoglucanases dos fungos TRAM01 e PC mantiveram atividade após a incubação por 48 h à temperatura de 50 °C. O PLE04 cessou as atividades de AVICELase em 12 h incubado a 50 °C.

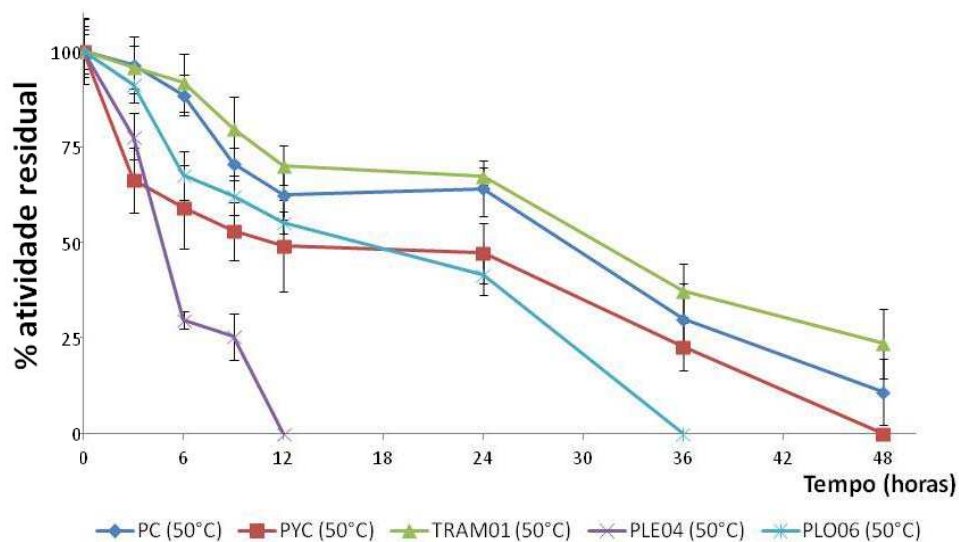


Figura 4.12 – Termostabilidade das atividades das exoglucanases (AVICELase) dos fungos *P. chrysosporium* **PC**, *P. sanguineus* **PYC02**, *T. versicolor* **TRAM01**, *P. eryngii* **PLE04** e *P. ostreatus* **PLO06**, obtidas por FES da palha de sorgo forrageiro. Entre parênteses têm-se as temperaturas em que cada extrato de fungo foi incubado (temperatura ótima aparente da AVICELase).

4.4.3.4 β -glicosidases

Os fungos PYC02 e PC apresentaram pH ótimo aparente de 7 para a atividade da β -glicosidases (Figura 4.13). Os outros fungos TRAM01, PLE04 e PLO06 apresentaram β -glicosidases com máxima atividade no pH 5.

As β -glicosidases isoladas de *Aspergillus terreus* M11, na fermentação em estado sólido (FES) em resíduos de milho, exibiram sua atividade máxima no pH 3, e mostraram estabilidade notável em pH 2 a 5 (GAO *et al.*, 2008). A β -glicosidase do fungo *Lentinus tigrinu* cultivado em palha de trigo apresentou pH ótimo aparente de 4 (LECHER & PAPINUTTI, 2006). Estas enzimas mostraram caráter mais ácido que as enzimas obtidas neste trabalho.

Almeida (2009) encontrou valores de pH ótimo para esta enzima na faixa de 4,5 a 5,0 e temperatura ótima de 60 °C para o fungo *Acremonium sp.* EA0810, cultivado em bagaço de cana, semelhantes aos resultados dos fungos avaliados neste trabalho.

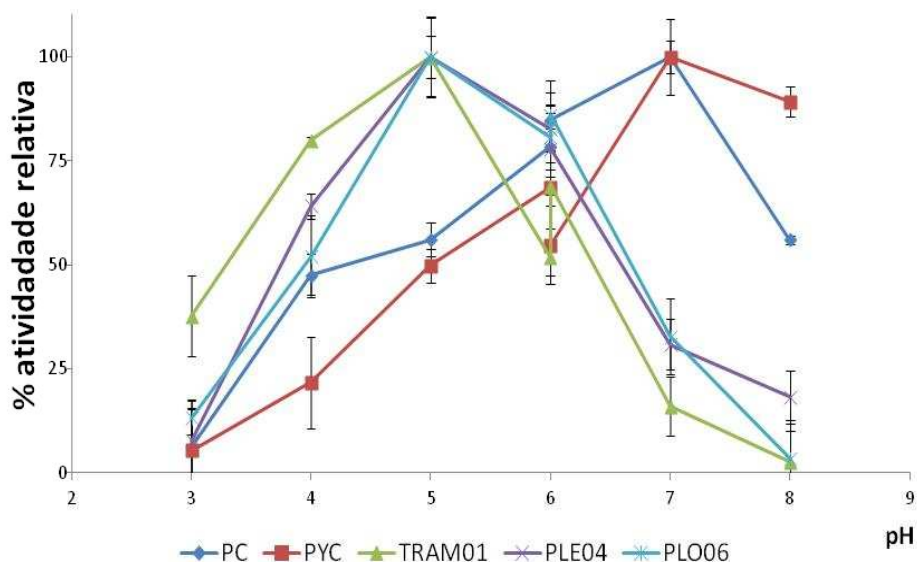


Figura 4.13 – Efeito do pH nas atividades das β -glicosidases dos fungos *P. chrysosporium* **PC**, *P. sanguineus* **PYC02**, *T. versicolor* **TRAM01**, *P. eryngii* **PLE04** e *P. ostreatus* **PLO06**, obtidas por FES da palha de sorgo forrageiro.

Para o efeito da temperatura na atividade das β -glicosidases (Figura 4.14), o fungo *P. sanguineus* PYC02 registrou atividade máxima dessa enzima à temperatura de 70 °C, sendo que a 80 °C estas enzimas apresentaram cerca de 80% da atividade.

GAO *et al.* (2008), na produção de celulases extracelulares por um fungo recentemente isolado *Aspergillus terreus* M11, na fermentação em estado sólido (SEF) em resíduos de milho, a atividade de β -glicosidase também apresentou o máximo a 70 °C.

A atividade de β -glicosidase do fungo *Trametes versicolor* TRAM01 apresentou temperatura ótima aparente de 60 °C, seguida pelo *Phanerochaete chrysosporium* PC com 50 °C de temperatura ótima. Os fungos do gênero *Pleurotus* apresentaram temperatura de máxima atividade a 40 °C.

Ximenez *et al.* (1996) encontraram pH e temperaturas ótimas de 5,0 e 65 °C para β -glicosidase para o fungo *Aspergillus fumigatus* crescido em papel de filtro, semelhante ao obtido para o fungo *T. versicolor* TRAM01 em relação ao pH e temperatura ótimos.

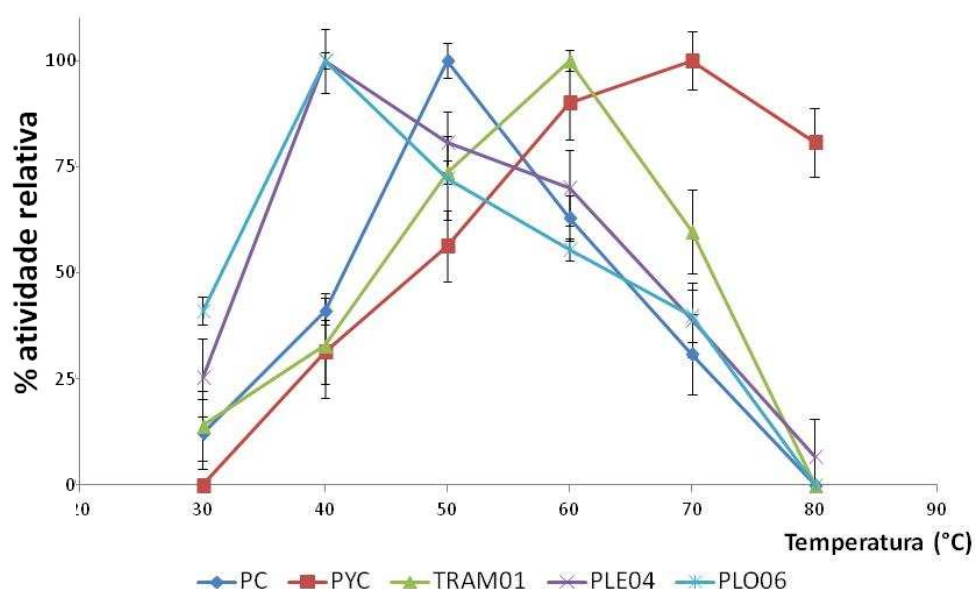


Figura 4.14 – Efeito da temperatura nas atividades das β -glicosidases dos fungos *P. chrysosporium* PC, *P. sanguineus* PYC02, *T. versicolor* TRAM01, *P. eryngii* PLE04 e *P. ostreatus* PLO06, obtidas por FES da palha de sorgo forrageiro.

Os resultados do estudo da termoestabilidade das β -glicosidases estão apresentados na Figura 4.15. Dentre todas as enzimas caracterizadas, a que mereceu maior destaque foi a β -glicosidase do *P. sanguineus* PYC02, com temperatura ótima de 70 °C e com estabilidade térmica (a 70 °C) de 48 h com atividade residual cerca de 30%. Celulases termoestáveis são consideradas ideais para aplicações biotecnológicas (SILVA e GOUVEIA, 2008).

GAO *et al.* (2008), obtiveram resultados semelhantes, na produção de celulases extracelulares por um fungo recentemente isolado *Aspergillus terreus* M11, na fermentação em estado sólido (SEF) em resíduos de milho, a atividade de β -glicosidase apresentou o máximo de 70 °C e mantida cerca de 53% da atividades original após incubação a 70 °C durante 6 horas.

A β -glicosidase do fungo *T. versicolor* TRAM01 incubada a 60 °C manteve mais de 50% de atividade após 48 h.

A β -glicosidase do fungo *Aspergillus niger* LTB mostrou-se pouco estável a 60 °C, já que reteve apenas 15% da sua atividade após ser incubada por 3,5 h (RODRIGUES, 2009), resultado bem inferior os fungo TRAM01, que também foi incubado a 60 °C.

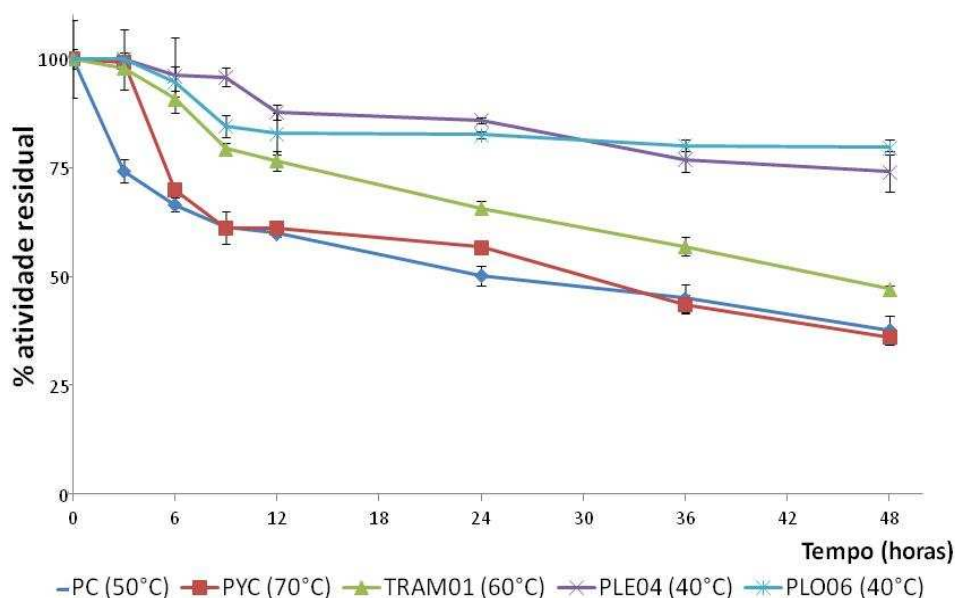


Figura 4.15 – Termoestabilidade das atividades das β -glicosidases dos fungos *P. chrysosporium* **PC**, *P. sanguineus* **PYC02**, *T. versicolor* **TRAM01**, *P. eryngii* **PLE04** e *P. ostreatus* **PLO06**, obtidas por FES da palha de sorgo forrageiro. Entre parênteses têm-se as temperaturas em que cada extrato de fungo foi incubado (temperatura ótima aparente da β -glicosidase).

O fungo *Lentinus tigrinu*, cultivado em palha de trigo, obteve 98% de atividade residual da enzima β -glicosidase depois de 42 h a 40 °C (LECHER & PAPINUTTI, 2006), acima dos resultados observados dos fungos PLE04 e PLO06, incubados na mesma temperatura.

4.4.4 - Sacarificação enzimática

Para a hidrólise enzimática foi utilizada a palha de sorgo *in natura* e as polpas de palha pré-tratada pelos métodos do ácido diluído, básico e ácido seguido pela deslignificação por base.

Fotografias dos materiais resultantes dos pré-tratamentos e da palha de sorgo *in natura* moída são mostradas na Figura 4.16.

Na Figura 4.16, pode-se observar as diferenças de cor entre os materiais. A polpa ácida encontra-se mais escura que a palha *in natura*, devido à concentração da lignina. A polpa ácida/deslignificada apresentou-se mais clara

em relação às demais, possivelmente devido ao maior conteúdo de celulose e ao baixo teor de lignina.



Figura 4.16 – Imagem dos materiais utilizados na sacarificação enzimática. **a** - palha de sorgo forrageiro moída *in natura*; **b** - polpa pré-tratada por ácido diluído (5%) por 15 min. a 120 °C; **c** - polpa pré-tratada por ácido base (5%) por 15 min. a 120 °C; **d** - polpa pré-tratada por ácido diluído (5%) por 15 minutos a 120 °C seguido por deslignificação básica (5%) por 15 min. a 120 °C.

A Figura 4.17 mostra a porcentagem de hidrólise das diferentes polpas e da palha do sorgo pelos extratos enzimáticos dos fungos da podridão branca.

A polpa básica atingiu valores próximos aos 50,0% de biomassa sacarificada, seguida pela polpa ácida/deslignificada com o percentual de 36,2%, após 72 h de sacarificação. Por se tratarem de materiais mais facilmente digeríveis, devido aos pré-tratamentos, isso era esperado. No entanto, era esperada também maior proporção de hidrólise da polpa ácida/deslignificada por conter menor teor de lignina e hemicelulose e maior de celulose. No entanto, a polpa básica foi a que obteve os maiores valores de sacarificação.

Hatakka (1983) reportou um resultado similar (42% de rendimento) na sacarificação de palha de trigo pré-tratada por álcali, enquanto o material não tratado alcançou somente 12% de rendimento.

A palha *in natura* apresentou os menores valores de sacarificação da biomassa (8 a 20%), seguida pela polpa ácida (5 a 28%).

Avaliando os complexos de cada fungo separadamente, o complexo multi-enzimático do fungo *P. eryngii* PLE04 atingiu como valor máximo somente 15% de hidrólise de biomassa do material nativo.

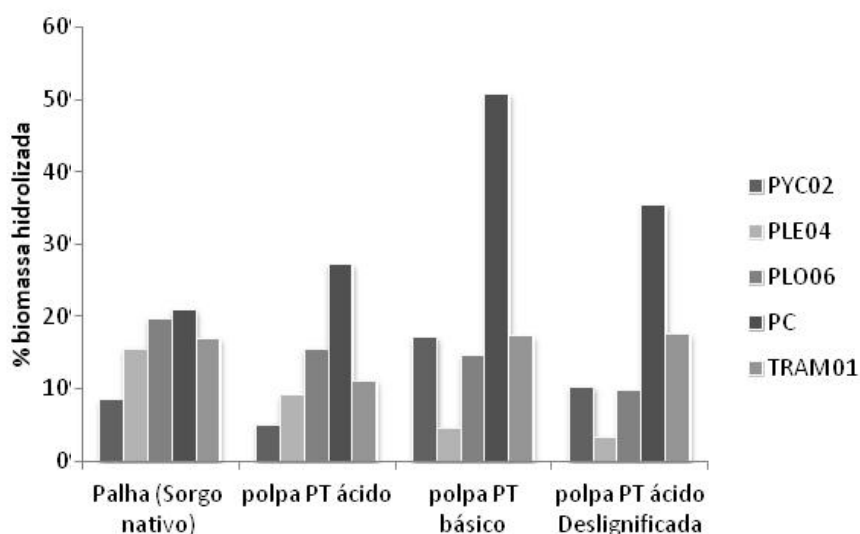


Figura 4.17 – Resultado em relação ao percentual de biomassa, da sacarificação da palha de sorgo forrageiro *in natura* e das polpas obtidas de pré-tratamento, pelos complexos multi-enzimas dos fungos, *Phanerochaete chrysosporium* **PC**, *Pycnoporus sanguineus* **PYC02**, *Trametes versicolor* **TRAM01**, *Pleurotus eryngii* **PLE04** e *Pleurotus ostreatus* **PLO06**, produzidos por FES.

Outro dado importante, em relação ao complexo multi-enzimas celulasas do fungo *P. eryngii* PLE04, foi que na sacarificação das polpas oriundas dos pré-tratamentos, os valores foram diminuindo, possivelmente devido ao aumento da concentração de celulose e à diminuição da hemicelulose, obtendo apenas 2,0% de hidrólise da polpa ácida/deslignificada. Na polpa ácida o valor também foi baixo, apenas 10% da biomassa o que pode estar ligado indiretamente à menor concentração de hemicelulose destas polpas.

O extrato enzimático do fungo *P. ostreatus* PLO06 também se destacou na sacarificação da palha não tratada, onde alcançou valor de sacarificação cerca de 20%.

Siqueira (2010) relatou que na hidrólise do bagaço não tratado, o extrato bruto do fungo *A. awamori* apresentou maior nível de hidrólise, alcançando cerca de 30%, após 24 horas de incubação, cerca de 60%, após 96 horas, resultado muito além dos obtidos neste trabalho, que alcançou um máximo de 20% após 72

h. No entanto, com relação aos materiais tratados este trabalho foi bem superior, pois na hidrólise do bagaço pré-tratado, o extrato bruto de *T. reesei* RUT C30 apresentou o melhor rendimento, de 25% e *A. awamori* de 12%, ambos após 48 horas de incubação (SIQUEIRA, 2010).

Apesar de apresentar maiores taxas de hidrólise do que o *P. eryngii* PLE04, o comportamento do complexo multi-enzimas do fungo *P. ostreatus* foi baixo, e os valores da sacarificação foram diminuindo com o aumento do teor de celulose das polpas.

O fato dos complexos multi-enzimáticos dos fungos *P. eryngii* PLE04 e *P.ostreatus* PLO06 obterem os menores valores de hidrólise dos materiais com maior teor de celulose, pode estar ligado à carga de enzima β -glicosidase (Tabela 4.4), que são menores em relação aos outros fungos.

A conversão enzimática da celulose em glicose depende do sinergismo de três enzimas no sistema de celulasas, que inclui endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase. O acúmulo final de celobiose ou glicose irá inibir as reações de hidrólise da celulose, sendo que a celobiose é um inibidor mais efetivo do que a glicose (DUFF e MURRAY, 1996; WEN *et al.*, 2004). Sem a hidrólise da celobiose devido ao baixo nível de β -glicosidase pode se levar a baixos níveis de sacarificação.

O complexo multi celulasas do *P. sanguineus* PYC02 apresentou maior sacarificação da polpa básica atingindo 17,21% (carga 9,14 FPU.g⁻¹ de celulose). Como o *P. sanguineus* PYC02 apresentou alta atividade de xilanase, cerca de 500 U.L⁻¹, esperava-se maior hidrólise da palha *in natura*.

O complexo multi celulasas do fungo *P. chrysosporium* PC obteve os maiores resultados na hidrólise da biomassa da palha *in natura* e nas três polpas obtidas do pré-tratamento. Dentre os resultados, destaca-se a polpa básica com o maior percentual de hidrólise, com 50% da biomassa. Em Mayrink (2010) o extrato enzimático do *Trichoderma* spp. C012 obteve cerca de 50% na hidrólise de AVICEL com carga enzimática (5 FPU.g⁻¹) em pouco mais de 10 horas de reação. Pode-se considerar como resultado semelhante ao nosso, apesar da carga do *P. chrysosporium* PC ser pouco maior, cerca de 8 FPU.g⁻¹.

A polpa ácida/deslignificada obteve o segundo maior valor de hidrólise, com 35% da biomassa hidrolisada.

Numa visão geral do processo, se for analisado o resultado das atividades das enzimas celulases desse fungo na Tabela 5.4, não há relação de atividade enzimática de alguma dessas celulases que explique o fato do fungo *P. chrysosporium* PC ter apresentado os melhores resultados.

O complexo multi celulases do fungo *T. versicolor* TRAM01 manteve resultados significativamente iguais em relação à biomassa sacarificada, em média 17%, para palha *in natura*, polpa básica e polpa ácida/deslignificada. Somente a polpa ácida apresentou valor inferior de apenas 11%.

Para a comparação entre os complexos multi-enzimáticos dos fungos com um complexo de enzimas comerciais, foi realizado a hidrólise da polpa ácida/deslignificada (por conter maior percentual de celulose, menos de 1% de lignina e hemicelulose). As enzimas comerciais mantiveram as mesmas condições de hidrólise dos fungos, carga de enzimas de 8,66 U.g⁻¹ de celulose e 8,40 U.g⁻¹ de biomassa. Na Figura 4.18, são apresentados os resultados da sacarificação da polpa ácida/deslignificada pelos cinco fungos e um complexo comercial de enzimas.

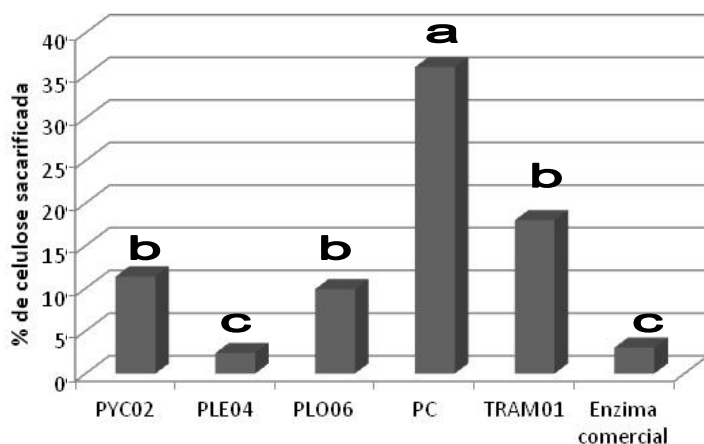


Figura 4.18 – Sacarificação da polpa obtida da palha de sorgo forrageiro pré-tratada por ácido e deslignificação, pelos complexos multi-enzimas dos fungos, *Phanerochaete chrysosporium* PC, *Pycnoporus sanguineus* PYC02, *Trametes versicolor* TRAM01, *Pleurotus eryngii* PLE04 e *Pleurotus ostreatus* PLO06,

produzidos por FES e uma enzima comercial (Multifect GC). Colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

Como se pode notar pela Figura 4.20, a maioria dos fungos obteve resultados significativamente maiores do que a enzima comercial, que alcançou apenas 3%. Deve-se lembrar de que este complexo de enzimas comerciais (celulases) foi diluído para as mesmas condições dos extratos ocorridas com os fungos, em relação à carga de enzimas/massa de celulose. Foi necessário diluir 130 vezes.

No estudo realizado no capítulo anterior, as mesmas enzimas comerciais alcançaram 95% de rendimento na hidrólise da polpa ácida/deslignificada da palha do sorgo. No entanto, a carga enzimática foi de 50 FPU.g⁻¹ de biomassa, e neste experimento foi cerca de 6 vezes menor, com rendimento 30 vezes menor.

Com isso, é possível avaliar que a concentração dos complexos enzimáticos obtidos dos fungos poderia resultar em maiores e melhores resultados de sacarificação, principalmente o complexo do fungo *P. chrysosporium* PC.

4.5 - CONCLUSÃO

A palha de sorgo forrageiro apresentou-se com um substrato para produção de celulases, além de xilanase e lacase por fungos da podridão branca. Na fermentação em estado sólido da palha de sorgo a produção de xilanase foi a mais expressiva entre as enzimas hidrolíticas.

Na caracterização das celulases o fungo *P. sanguineus* PYC02 apresentou atividade ótima da β -glicosidade a temperatura de 70 °C, com significativa atividade a 80 °C e com termoestabilidade por mais de 48 horas a temperatura de 70 °C.

Na sacarificação da palha e das polpas pré-tratadas, destaca-se a polpa básica, que apresentou os maiores níveis de hidrólise para a maioria dos fungos.

O complexo multi-celulases do fungo *P.chrysosorium* PC hidrolisou cerca de 50% de biomassa da polpa básica, após 72 horas de reação e com carga de apenas 8 FPU.g⁻¹ de biomassa. Nas mesmas condições, a enzima comercial hidrolisou apenas 3% de hidrólise. A maioria dos complexos multi-celulases obtidos dos fungos da podridão branca por FES da palha de sorgo, apresentou maiores taxas de degradação em comparação com a enzima comercial.

5 - CAPITULO III

**COQUETEL MÍNIMO DE ENZIMAS PARA ATIVIDADES
CELULOSE TOTAL DOS EXTRATOS OBTIDOS DE FUNGOS DE
PODRIDÃO BRANCA, POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO**

5.1 - INTRODUÇÃO

O complexo enzimático clássico é composto por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. O efeito desse complexo enzimático é expresso pela ação sinérgica dessas três diferentes classes de enzimas (LEE, 1997).

O exato mecanismo da hidrólise da celulose não é conhecido, embora um número de possíveis modelos tenha sido proposto. Entretanto, sabe-se que as celulasas atuam de maneira corporativa ou sinérgica (LEE, 1997). A forma corporativa começa quando as endoglucanases rompem a molécula linear de celulose, produzindo extremidades redutoras e não-redutoras que podem ser atacadas pela exoglucanases. Assim, as exoglucanases atuam removendo pequenas cadeias de celulose e expondo mais sítios internos para as endoglucanases poderem se ligar. A atividade de todas as celulasas, em particular as exoglucanases, é inibida pela celobiose. Logo, a clivagem da celobiose em glicose pela β -glicosidase reduz grandemente esta inibição, permitindo a continuidade da atividade celulolítica (GOYAL *et al.*, 1991).

Os diferentes organismos celulolíticos têm evoluído para produzir um arranjo de celulasas que, por meio de diferentes modos de ação e especificidade de substrato, permitem explorar substratos bastante heterogêneos. Por exemplo, o fungo *Trichoderma reesei* produz quatro endoglucanases e duas celobiohidrolases (CBHI e CBHII). As CBHI e CBHII são imunologicamente distintas, analisadas por anticorpos policlonais. As unidades de celobiose repetitivas da celulose ocorrem em duas formas estequiométricas diferentes, levando à hipótese que existem duas formas esterioespecíficas de endoglucanases. Esta multiplicidade de formas de celulasas poderia ser provocada por uma glicosilação diferencial ou proteólise parcial. Além disso, a partir da clonagem gênica, sabe-se que existe um número limitado de genes de celulase. Logo, a multiplicidade desta enzima deve ser, em grande parte, por modificações pós-traducionais (DUFF e MURRAY, 1996).

A hidrólise enzimática da celulose de fontes de biomassa requer atividades enzimáticas múltiplas, para geração de monossacarídeos fermentescíveis. O conceito de coquetel mínimo de enzima é a identificação do número mínimo, os

níveis mínimos e a combinação ótima de melhor desempenho de atividades enzimáticas para alcançar os resultados, seja a sacarificação ou atividades. Duas hipóteses principais estão por trás deste conceito: 1 - que o perfil bruto dos multicomponentes celulolíticos de preparações enzimáticas não é o ótimo para a degradação de celulose de biomassa ligninocelulósica pré-tratada; 2 - que é possível substituir um preparado bruto multi-enzimas com combinações designadas, para o número mínimo exigido de atividades de enzimas para o processamento da biomassa (MEYER *et al.*, 2009).

A razão biológica para *T. reesei* produzir os diferentes específicos níveis de atividades celulolíticas e, nomeadamente, cinco diferentes endo-1,4- β -glucanase não é conhecido atualmente. No entanto, uma hipótese óbvia que o perfil de multi-componentes nativos das celulasas do *T. reesei* não é necessariamente ótimo para a degradação de celulose em materiais ligninocelulósicos. Assim, faz-se necessário uma produção projetada de coquetéis, otimizados para utilizar o mínimo de multicomponentes nos extratos para o máximo de atividade e ou degradação, dentro do conceito de coquetel mínimo de enzimas (MEYER *et al.*, 2009).

5.2 - OBJETIVOS

Cada fungo possui um complexo multienzimático diferenciado, o qual pode ser melhorado. Sendo assim, este trabalho teve como objetivos:

- Medir as atividades de Celulase total dos complexos multi-celulases (extratos brutos) dos cinco fungos da podridão branca, produzidos por FES em palha de sorgo;
- Otimizar a atividade de Celulase total dos coquetéis de extratos bruto dos cinco fungos da podridão branca, por meio do delineamento experimental e gráficos de superfície de resposta;
- Estabelecer os níveis dos extratos enzimáticos dos cinco fungos do coquetel mínimo de extratos.

5.3 - MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 - Produção de celulases por fermentação em estado sólido

Para a fermentação em estado sólido foi utilizada a palha de sorgo forrageiro BRS 655 (palha e colmo sem os grãos), cultivar desenvolvido pela Embrapa Milho e Sorgo, cultivado no município de Sete Lagoas. O sorgo foi cortado com 120 dias de plantio e seco ao sol e moído em picadeira. O material moído foi armazenado em local seco, ao abrigo de luz e umidade.

A palha de sorgo foi transformada em substrato, somente com a adição de água, apresentando umidade final de 50%. Cada 100 g de substrato preparado foram acondicionados em sacos de polipropileno com filtro, fechados com fita adesiva para posterior autoclavagem.

Depois de esterilizado a 121 °C por 90 minutos e resfriado à temperatura ambiente, cada saco de polipropileno com substrato recebeu dois discos de 2 cm de diâmetro do micélio de cada fungo, previamente cultivado em placa de Petri com BDA por 7 dias a 30 °C.

Foram avaliados os fungos de podridão branca, *Pleurotus ostreatus* PLO 06, *Pleurotus eryngii* PLE 04, *Trametes versicolor* TRAM 01, *Pycnosporus sanguineus* PYC 02 e *Phanerochaete chrysosporium* PC, pertencentes à coleção do Departamento de Microbiologia/UFV.

A metodologia de cultivo foi descrita por Silva (2001). Na replicação, os fungos foram mantidos em tubos de ensaio, contendo o meio de cultivo batata dextrose ágar (BDA), esterilizado a 121 °C por 15 min. Após o crescimento fúngico, por 7 dias a 30 °C, os tubos foram refrigerados a 4 °C. Posteriormente, os fungos foram novamente replicados em placa de Petri, para a retirada do inóculo na forma de discos de 2 cm.

Os sacos foram inoculados em capela de fluxo de laminar e incubados em BOD com temperatura controlada a 28 °C, até a completa colonização do substrato. O acompanhamento do crescimento micelial foi realizado visualmente. Depois de alcançada a total colonização, de 15 a 20 dias para todos os fungos, as atividades das enzimas celulósicas foram avaliadas em vários dias após a inoculação.

5.3.2 - Extração dos complexos enzimáticos

Amostras de 5 g de cada substrato foram colocadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de tampão citrato de sódio (50 mM e pH 4,8) e agitados a 150 rpm, por 2 horas a 5 °C. Em seguida, foram filtradas em peneiras e colocadas em tubos Eppendorf de 2 mL, seguindo para centrifugados a 12000 g a 5 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, sendo posteriormente identificado com o fungo e o tempo de incubação, fechado e armazenado em freezer a -18 °C.

5.3.3 - Ensaios enzimáticos

Para a determinação da atividade Celulase total ou FPAse, seguiu-se o método descrito por Ghose (1986), com algumas modificações. Tiras de aproximadamente 1 x 6 cm (50 mg) de papel de filtro Whatman #1, recortadas e enroladas, foram adicionadas aos tubos de ensaio pré-incubados a 50°C contendo 1,5 mL de tampão e 500 µL do extrato enzimático. Após 1 hora de incubação, a hidrólise foi interrompida com a adição de 3 mL de DNS, seguindo para a quantificação por este método (MILLER, 1956).

A absorbância da solução foi medida a 540 nm e a concentração de açúcares redutores totais determinados com base em uma curva de calibração de glicose previamente estabelecida. Uma unidade (FPU) de Celulase total ou FPAse foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de equivalentes de açúcar redutor total em 1 minuto, nas condições de ensaio.

Todos os controles foram utilizados, com o branco (tampão), o branco-enzima (sem extrato enzimático) e o branco-substrato (sem substrato).

5.3.4 - Delineamento Experimental

Para o processo de otimização da atividade de Celulase total os complexos multi-enzimas celulasas (extratos brutos) de cada fungo foram misturados simultaneamente em diferentes volumes. A otimização foi realizada para o valor máximo de atividade de Celulase total (FPAse).

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi realizado com cinco variáveis correspondentes aos extratos dos seguintes fungos: extratos de

Pleurotus ostreatus PLO06, *Pleurotus eryngii* PLE04, *Trametes versicolor* TRAM01, *Pycnosporus sanguineos* PYC02 e *Phanerochaete chrysosporium* PC, e os níveis estudados (Tabela 5.1), sendo os diferentes volumes (µL) de extrato bruto de cada fungo.

A matriz DCCR (Tabela 5.2) gerada pelo software Design-Expert 8.0, para as cinco variáveis, totalizou 50 ensaios.

Tabela 5.1- Fatores e níveis dos fatores da matriz DCCR ($2^5 + 8$ pontos centrais + 10 axiais)

Fatores	Nível dos fatores (µL de extrato bruto)				
	-2,68	-1	0	+1	+2,68
<i>Pleurotus ostreatus</i> PLO06	31,079	100	150	200	268,921
<i>Pleurotus eryngii</i> PLE04	31,079	100	150	200	268,921
<i>Trametes versicolor</i> TRAM01	31,079	100	150	200	268,921
<i>Pycnosporus sanguineos</i> PYC02	31,079	100	150	200	268,921
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> PC	31,079	100	150	200	268,921

Tabela 5.2- Matriz DCCR para a otimização da atividade enzimática FPAse em diferentes níveis de extratos brutos obtidos de fungos de podridão branca, *Pleurotus ostreatus* PLO06, *Pleurotus eryngii* PLE04, *Trametes versicolor* TRAM01, *Pycnosporus sanguineos* PYC02 e *Phanerochaete chrysosporium* PC por fermentação em estado sólido da palha de sorgo

Ensaio	Níveis originais				
	PYC02	PC	TRAM0	PLE04	PLO06
	µL de extrato bruto				
1	100	100	200	200	200
2	200	100	200	100	200
3	100	100	200	100	100
4	100	200	200	100	200
5	150	150	150	31,0792	150
6	200	200	200	100	100
7	150	150	150	150	150
8	150	150	150	150	150
9	100	200	200	100	100
10	200	200	100	100	100
11	150	150	150	150	150
12	150	150	150	150	150
13	100	200	100	100	200
14	150	150	150	150	31,0792
15	150	268,92	150	150	150
16	200	100	200	200	200
17	200	100	200	100	100
18	200	200	100	200	200
19	100	100	200	100	200

20	200	100	100	200	200
21	150	150	150	150	150
22	100	200	100	200	100
23	200	100	100	100	200
24	100	200	200	200	100
25	100	100	100	100	100
26	200	200	200	200	200
27	200	200	200	100	200
28	100	200	100	200	200
29	150	31,079	150	150	150
30	200	200	100	200	100
31	100	100	100	200	200
32	200	100	200	200	100
33	150	150	150	150	268,920
34	268,92	150	150	150	150
35	150	150	150	150	150
36	150	150	268,9207	150	150
37	31,079	150	150	150	150
38	100	100	200	200	100
39	100	100	100	200	100
40	150	150	150	150	150
41	200	100	100	100	100
42	200	100	100	200	100
43	150	150	31,07929	150	150
44	150	150	150	150	150
45	200	200	200	200	100
46	100	100	100	100	200
47	100	200	100	100	100
48	200	200	100	100	200
49	150	150	150	268,920	150
50	100	200	200	200	200

5.3.5 - Análises estatísticas

No Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), os resultados foram analisados estatisticamente por meio de análises de variância e de regressão, considerando-se a falta de ajuste, a significância dos parâmetros e o coeficiente de regressão. Por meio da análise da metodologia de superfície de resposta, determinaram-se as melhores condições para a máxima atividade de Celulase total nas de condições experimentais utilizados. Com o uso da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), as relações entre os fatores e a resposta podem ser melhor compreendidas, ficando visível o comportamento de cada variável sobre a resposta estudada, neste caso, a atividade celulolítica.

Os resultados foram analisados utilizando o software Design-Expert 8.0 ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Foi considerado para o planejamento de seleção de níveis das variáveis o valor de 5 % ($p < 0,05$) para o DCCR.

5.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 - Produção de celulases por fermentação em estado sólido

Os extratos enzimáticos foram produzidos a partir da colonização total, após 20 dias de inoculação.

As atividades de Celulase total dos fungos de podridão branca estão mostradas na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Atividades enzimáticas U.L⁻¹ dos extrato enzimáticos dos fungos de podridão branca, obtido por fermentação em estado sólido da palha do sorgo forrageiro

Fungo	Celulase total (FPase) (U.L ⁻¹)
<i>Pycnoporus Sanguineos</i> PYC02	89,78 $\pm$ 4,98
<i>Pleurotus ostreatus</i> PLO06	94,05 $\pm$ 1,82
<i>Pleurotus eryngii</i> PLE04	83,70 $\pm$ 2,47
<i>Phanerochaete chrysosorium</i> PC	128,11 $\pm$ 9,82
<i>Trametes versicolor</i> TRAM01	144,88 $\pm$ 8,65

5.4.2 - Otimização das atividades de Celulase total

Na otimização da atividade Celulase total do coquetel de extratos enzimáticos (mistura dos extratos brutos dos cinco fungos), através do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), foram avaliados os efeitos da quantidade de cada um dos cinco extratos fúngicos (em μ L), adicionados simultaneamente, no resultado final de atividade de Celulase total.

Os resultados das atividades enzimáticas da FPase pelo DCCR podem ser visualizados na matriz da Tabela 5.4.

Numa avaliação direta, pode-se verificar que a mistura dos extratos levou ao aumento na atividade de Celulase total, em comparação com os extratos individuais de cada fungo (Tabela 5.3). Todos os valores foram maiores em qualquer proporção da mistura dos cinco fungos simultaneamente. O valor máximo encontrado foi de 304,86 U.L⁻¹. Possivelmente, isto é devido à presença de várias isoenzimas ativas no extrato de diferentes culturas trabalhando sinergisticamente, o que foi sugerido por outros pesquisadores (MANSUR *et al.*, 2003; THURSTON, 1994).

Tabela 5.4 – Matriz DCCR com os resultados das atividades enzimáticas FPase U.L⁻¹ de extrato de enzimas dos fungos da podridão branca, *P. ostreatus* PLO06, *P. eryngii* PLE04, *T. versicolor* TRAM01, *P. sanguineus* PYC02 e *P. chrysosporium* PC, obtido por fermentação em estado sólido da palha do sorgo forrageiro

Ensaio	PYC02	PC	TRAM01	PLE04	PLO06	Atividade
	μL de extrato bruto					Enzimática (U.L ⁻¹)
1	100	100	200	200	200	267,43
2	200	100	200	100	200	263,80
3	100	100	200	100	100	293,94
4	100	200	200	100	200	278,89
5	150	150	150	31,079	150	276,56
6	200	200	200	100	100	295,12
7	150	150	150	150	150	258,98
8	150	150	150	150	150	269,37
9	100	200	200	100	100	298,65
10	200	200	100	100	100	292,54
11	150	150	150	150	150	265,09
12	150	150	150	150	150	259,59
13	100	200	100	100	200	273,34
14	150	150	150	150	31,079	298,10
15	150	268,921	150	150	150	276,64
16	200	100	200	200	200	270,48
17	200	100	200	100	100	284,47
18	200	200	100	200	200	266,06
19	100	100	200	100	200	277,05
20	200	100	100	200	200	244,71
21	150	150	150	150	150	246,97
22	100	200	100	200	100	302,58
23	200	100	100	100	200	260,46
24	100	200	200	200	100	304,86
25	100	100	100	100	100	271,45
26	200	200	200	200	200	277,80
27	200	200	200	100	200	271,84
28	100	200	100	200	200	271,44
29	150	31,079	150	150	150	269,05
30	200	200	100	200	100	284,62
31	100	100	100	200	200	251,95
32	200	100	200	200	100	285,38
33	150	150	150	150	268,921	249,74
34	268,921	150	150	150	150	260,46
35	150	150	150	150	150	223,34
36	150	150	268,921	150	150	288,42
37	31,079	150	150	150	150	292,05
38	100	100	200	200	100	295,38
39	100	100	100	200	100	286,05
40	150	150	150	150	150	262,65
41	200	100	100	100	100	276,37
42	200	100	100	200	100	275,74
43	150	150	31,079	150	150	258,65
44	150	150	150	150	150	270,79
45	200	200	200	200	100	289,83
46	100	100	100	100	200	258,80
47	100	200	100	100	100	288,59
48	200	200	100	100	200	261,32
49	150	150	150	268,921	150	274,53
50	100	200	200	200	200	276,59

Na avaliação de regressão dos dados o modelo quadrático foi significativo ($p < 0,05$).

Na análise de variância (Tabela 5.5) do modelo quadrático sugerido, não houve interação significativa entre os fungos. No entanto, todos os efeitos quadráticos dos fatores foram significativos.

Tabela 5.5 – ANOVA para superfície de resposta do modelo quadrático da otimização das atividades enzimáticas de coquetéis dos extratos de fungos da podridão branca, *P. ostreatus* PLO06, *P. eryngii* PLE04, *T. versicolor* TRAM01, *P.s sanguineos* PYC02 e *P. chrysosporium* PC, obtidos por FES da palha do sorgo. C.V. % **3.51 – R^2 0.7987 . (n.s – não significativo)**

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F	Valor p Prob > F	
Modelo	10651,64	20	532,5818	5,753256	< 0.0001	significativo
A-PYC02	346,6336	1	346,6336	3,744537	0.0628	n.s
B-PC	66,93578	1	66,93578	0,723079	0.4021	n.s
C-TRAM01	81,40932	1	81,40932	0,879431	0.3561	n.s
D-PLE04	212,766	1	212,766	2,298422	0.1403	n.s
E-PLO06	582,308	1	582,308	6,290428	0.0180	significativo
AB	7,187708	1	7,187708	0,077646	0.7825	n.s
AC	4,267705	1	4,267705	0,046102	0.8315	n.s
AD	22,55626	1	22,55626	0,243666	0.6253	n.s
AE	10,60948	1	10,60948	0,11461	0.7374	n.s
BC	109,9578	1	109,9578	1,187828	0.2847	n.s
BD	16,14526	1	16,14526	0,17441	0.6793	n.s
BE	0,917227	1	0,917227	0,009908	0.9214	n.s
CD	0,43488	1	0,43488	0,004698	0.9458	n.s
CE	21,29865	1	21,29865	0,23008	0.6351	n.s
DE	55,98245	1	55,98245	0,604755	0.4431	n.s
A²	911,3072	1	911,3072	9,844468	0.0039	significativo
B²	660,1146	1	660,1146	7,130939	0.0123	significativo
C²	707,3259	1	707,3259	7,640944	0.0098	significativo
D²	855,3971	1	855,3971	9,240494	0.0050	significativo
E²	734,8959	1	734,8959	7,93877	0.0086	significativo
Resíduo	2684,544	29	92,57049			significativo
Falta de ajuste	999,1638	22	45,41654	0,188631	0.9988	n.s
Erro puro	1685,38	7	240,7686			
Total	13336,18	49				

O coeficiente de determinação R^2 de 0,79, aceitável para experimentos biológicos (RODRIGUES e IEMMA, 2005), indicou que a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi de 79%.

A Tabela 5.5 (ANOVA) demonstrou que o modelo quadrático ajustado para as respostas do processo é satisfatório. Assim, os valores preditos para a atividade FPAse foram ajustados pela equação abaixo, em termos dos fatores reais:

$$\text{Atividade enzimática (FPAse)} = +415.15104 - 0.64677 \cdot \text{PLO} + 1.61986 \cdot 10^{-3} \cdot \text{PYC}^2 + 1.37865 \cdot 10^{-3} \cdot \text{PC}^2 + 1.42710 \cdot 10^{-3} \cdot \text{TRAM}^2 + 1.56938 \cdot 10^{-3} \cdot \text{PLE}^2 + 1.45464 \cdot 10^{-3} \cdot \text{PLO}^2$$

Pela análise da equação quadrática da atividade de Celulase total versus volume de extrato enzimático dos cinco fungos, tem-se o componente linear PLO06 que atua (coeficiente negativo) diminuindo o valor de Y.

A Figura 5.1 mostra o comportamento do extrato de cada fungo atuando separadamente sobre a atividade Celulase total, mantendo os outros fatores no nível 0 (150 µL), tornando mais fácil a análise da equação proposta.

De acordo com a equação proposta, o aumento do extrato enzimático dos fungos PC e TRAM01 apresentou a maior complementação na atividade, o que pode ser confirmado analisando a Figura 5.1. O aumento da participação do fungo PLE04 praticamente não alterou a atividade final. Os fungos PYC02 e PLO06 proporcionaram as menores atividades FPAse. No entanto, esses gráficos da variação de único fator são limitados pela fixação dos outros fatores e não se tem um coquetel mínimo de enzimas, sendo necessária a utilização de gráficos de superfície de resposta.

Como não houve interação significativa, os gráficos de superfície de resposta para a variável resposta foram obtidos dados os efeitos aditivos dos fatores.

Os gráficos de superfície de resposta para a atividade de Celulase total são apresentados nas Figuras 5.2 a 5.11. Estes gráficos foram gerados no programa Design-expert 8.0, baseado na equação quadrática determinada, buscando a otimização da atividade Celulase total.

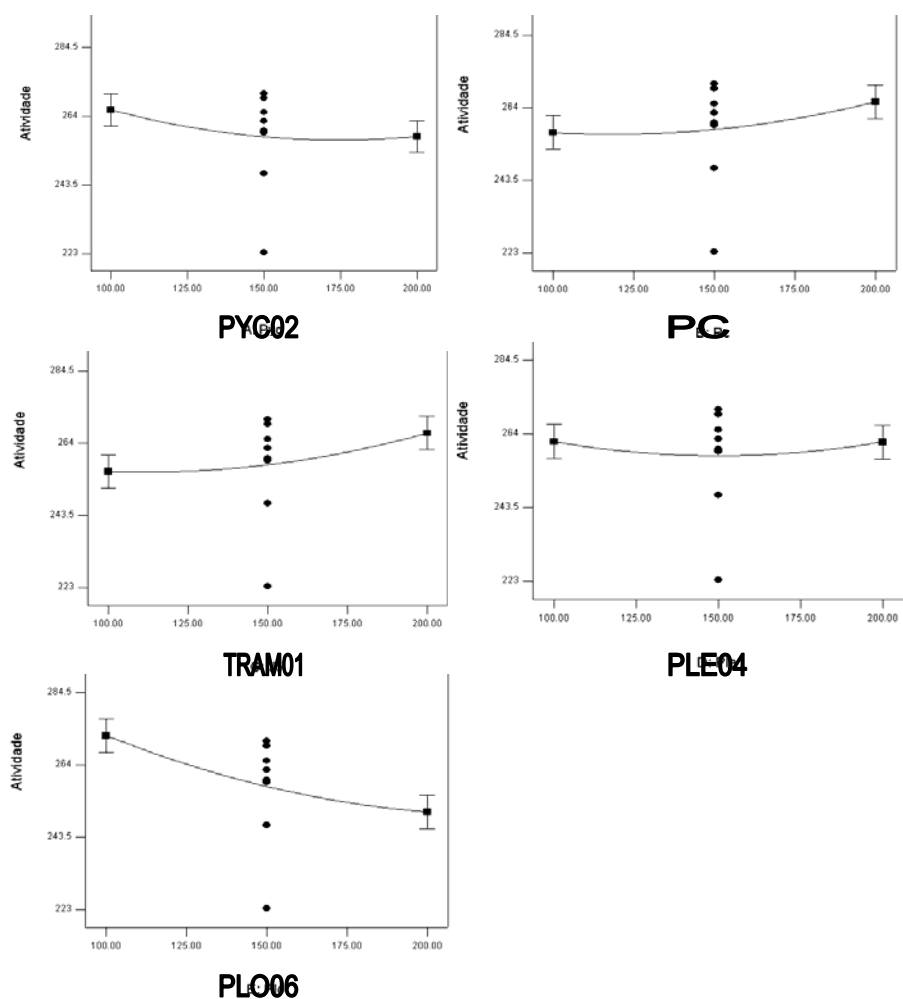


Figura 5.1 - Gráficos das variações dos níveis de um único fator para atividade de FPase.

Com os dados obtidos da otimização numérica (Tabela 5.6), os gráficos de superfície de resposta da atividade de FPase foram gerados pela variação de volume entre dois (fatores) extratos dos cinco fungos. Os outros fatores foram fixados nos valores estabelecidos pela otimização numérica gerada. Assim, as variações dos dois fatores, dentro dos níveis mínimo e máximo, geram uma superfície de resposta buscando o valor de máximo na variável resposta.

Esses gráficos permitem a visualização do comportamento da mistura dos extratos e a obtenção de regiões de máximo, ou de mínimo, dentro dos níveis estudados. Também, no estudo dos gráficos gerados pode se estabelecer para a

máxima atividade, níveis mínimos de extratos dos fungos, ou seja, o coquetel mínimo de enzimas, diferente do proposto pela otimização numérica (Tabela 5.6)

Tabela 5.6- Níveis dos fatores para o máximo da atividade de Celulose total (302.945 U.L⁻¹)

Fator	Nível	Nível inferior	Nível superior
PYC02	100.00	100.00	200.00
PC	200.00	100.00	200.00
TRAM01	200.00	100.00	200.00
PLE04	200.00	100.00	200.00
PLO06	100.00	100.00	200.00

Na superfície de resposta da Figura 5.2 entre os complexos multi-celulases (extrato bruto) dos fungos PLO06 e PYC02, a relação entre os fungos estabelece como ponto de máximo (302,54 U/L) os volumes de 100 µL do PLO e do PYC02. É possível visualizar na região de máxima atividade, que os níveis de cada fator para a otimização, não podem ser alterados para menores volumes sem alterar a máxima atividade.

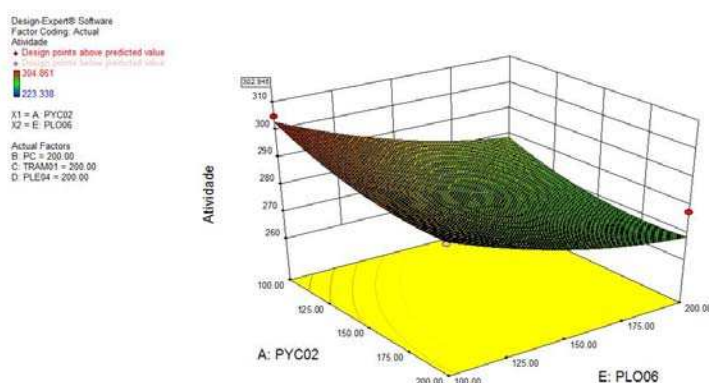


Figura 5.2 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total em função das variações dos volumes (µL) de extratos dos fungos PLO06 e PYC02. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PC 200,00 µL, TRAM 200,00 µL e PLE04 200,00 µL.

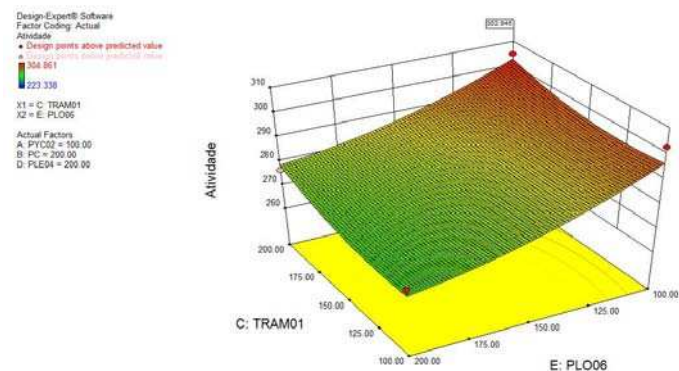


Figura 5.3 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total em função das variações dos volumes (μL) de extratos dos fungos PLO06 e TRAM01. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PYC02 100,00 μL , PC 200,00 μL e PLE04 200,00 μL .

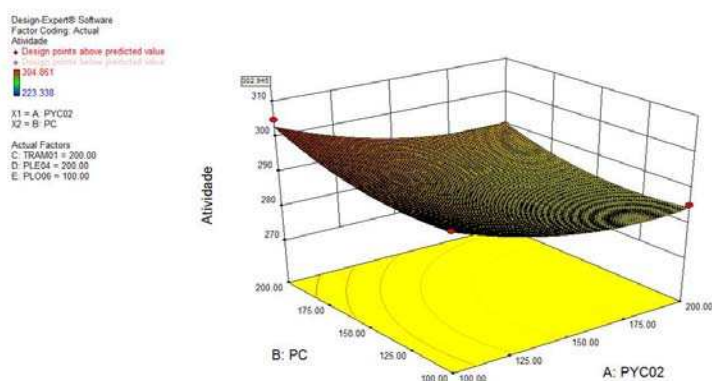


Figura 5.4 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total em função das variações dos volumes (μL) de extratos dos fungos PC e PYC02. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: TRAM01 200,00 μL , PLE04 200,00 μL e PLO06 100,00 μL .

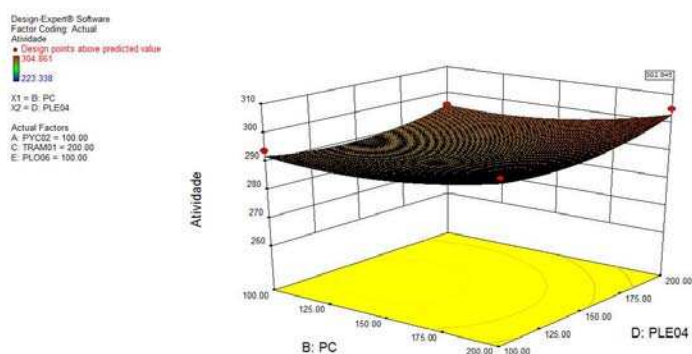


Figura 5.5 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total em função das variações dos volumes (μL) de extratos dos fungos PC e PLE04.

A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PYC02 100,00 μ L, TRAM01 200,00 μ L e PLO06 100,00 μ L.

Na Figura 5.5, o ponto de máximo corresponde aos volumes de extrato de 200 μ L do fungo PLE04 e PC (Tabela 5.6). Esse gráfico mostra que entre os dois extratos, praticamente toda a área da superfície está próxima ao máximo, ou seja, qualquer níveis destes dois fatores, nas condições fixas dos outros, resulta em máxima atividade. Assim, é possível alterar os volumes dos extratos do fungo PLE04 e do PC, de 200 μ L para 100 μ L, sem alteração na atividade máxima de FPase. Ao final, tem-se uma mudança na formulação de coquetel proposto como ótimo (Tabela 5.6), para o coquetel mínimo de enzimas, com 100,00 μ L PYC02; 100,00 μ L PC; 100,00 μ L PLO06; 100,00 μ L PLE04 e 200 μ L TRAM01, mantendo o máximo de atividade com o mínimo de extratos.

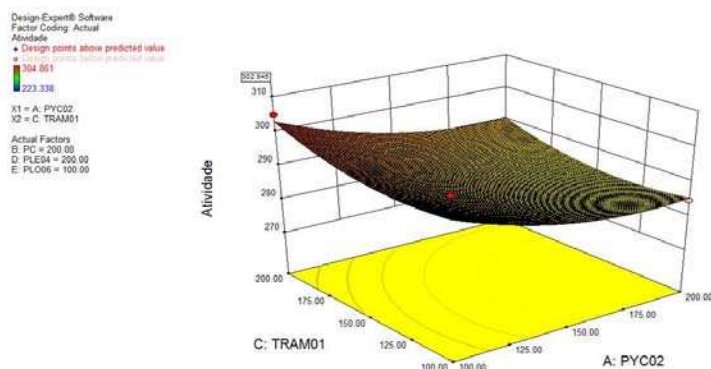


Figura 5.6 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total em função das variações dos volumes (μ L) de extratos dos fungos TRAM01 e PYC02. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PC 200,00 μ L, PLE04 200,00 μ L e PLO06 100,00 μ L.

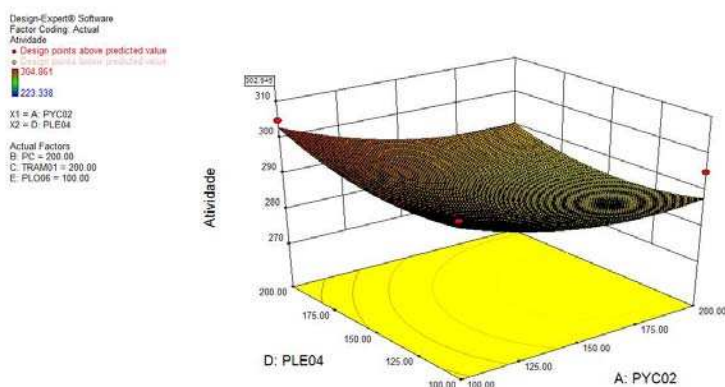


Figura 5.7 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total em função das variações dos volumes (μL) de extratos dos fungos PYC02 e PLE04. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PC 200,00 μL , TRAM01 200,00 μL e PLO06 100,00 μL .

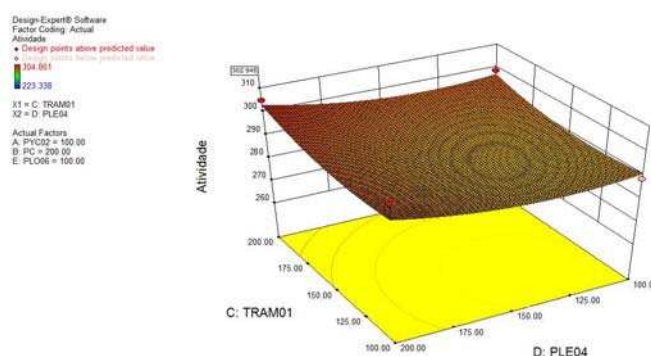


Figura 5.8 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total em função das variações dos volumes (μL) de extratos dos fungos TRAM01 e PLE04. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PYC 100,00 μL , PC 200,00 μL e PLO06 100,00 μL .

A Figura 5.8 também mostra a mesma relação encontrada na Figura 5.6, onde toda a área da superfície está próxima ao máximo, ou seja, qualquer quantidade volume de extratos dos dois fungos (dentro dos níveis máximo e mínimo estabelecidos), nas condições fixas dos outros fatores, resulta em máxima atividade. Novamente, deve-se escolher os níveis mínimos para compor o coquetel final. Neste caso, pode-se trabalhar com apenas 100 μL do extrato do fungo TRAM01. Ao final, teríamos um coquetel diferente do proposto (Tabela 5.6), com 100,00 μL PYC02; 200,00 μL PC; 100,00 μL PLO06; 200,00 μL PLE04; e 100 μL TRAM01. No entanto, o coquetel formado anteriormente, na Figura 5.5, oferece menores níveis de extratos.

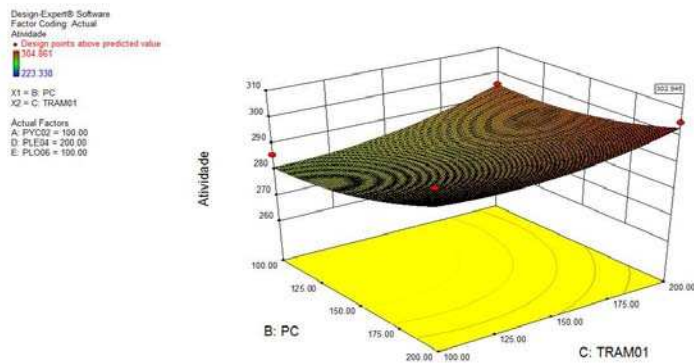


Figura 5.9 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total em função das variações dos volumes (μL) de extratos dos fungos PC e TRAM01. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PYC 100,00 μL , PLE04 200,00 μL e PLO06 100,00 μL .

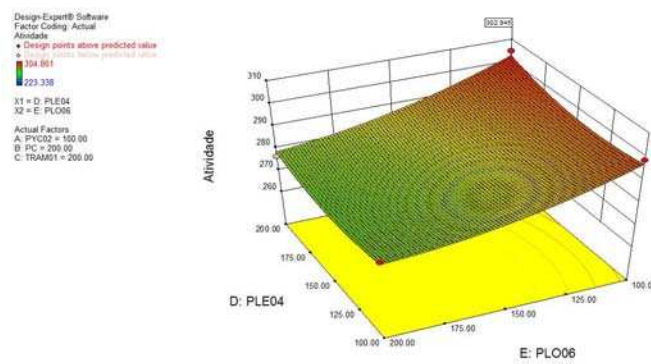


Figura 5.10 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total em função das variações dos volumes (μL) de extratos dos fungos PLO06 e PLE04. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PYC 100,00 μL , PC 200,00 μL e TRAM01 200,00 μL .

Na Figura 5.10, também é possível obter um coquetel diferente do estabelecido, sendo que ao invés de se utilizar 200,00 μL de extratos de PLE04 deve ser usar somente 100 μL , mantendo o máximo de atividade FPAse (região de máximo na figura é estabelecida por qualquer quantidade de PLE04). Este coquetel proposto seria formado pelos outros fatores em valores fixos, PYC 100,00 μL , PC 200,00 μL e TRAM01 200,00 μL . e o PLO06 de 100 μL .

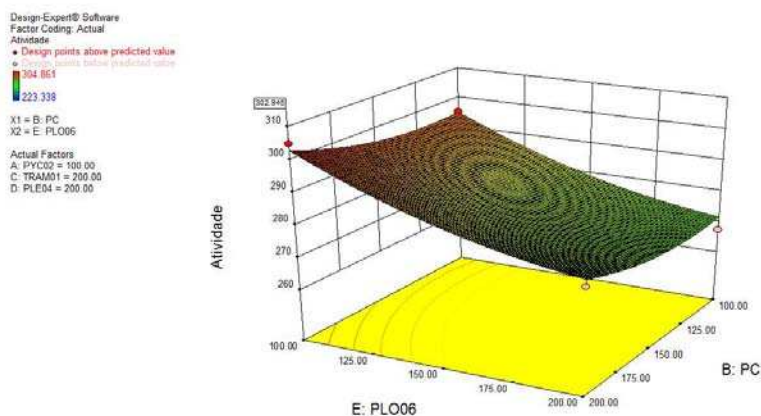


Figura 5.11 - Superfície de resposta da otimização da atividade de Celulase total em função das variações dos volumes (μL) de extratos dos fungos PLO06 e PC. A quantidade dos outros fatores (extratos dos fungos) foi fixada: PYC 100,00 μL , TRAM 200,00 μL e PLE04 200,00 μL .

Somente os gráficos da Figura 5.5, 5.8 e 5.10 permitiram realizar diminuições nos níveis, mantendo a atividade no máximo, enquanto os outros gráficos não ofereceram nas regiões de máximo mudança dos níveis dos fatores para menores valores.

Como não ocorreu o aparecimento de nenhum ponto de sela ou uma “dobra” na superfície dos gráficos que pudesse indicar um ponto máximo, conclui-se que os valores de máximo da otimização estão restritos aos níveis estabelecidos de volume dos extratos testados.

A Figura 5.5 apresentou o coquetel mínimo de enzimas (extratos) para a máxima atividade de Celulase total, com 100,00 μL PYC; 100,00 μL PC; 100,00 μL PLO06; 100,00 μL PLE04 e 200 μL TRAM01.

Outros trabalhos mostram a viabilidade de se trabalhar com coquetéis, pelo aumento nas atividades enzimáticas ou do nível de hidrólise de biomassa ligninocelulósicas.

Mayrink (2010), trabalhando com a produção de coquetéis celulósicos pela mistura de extratos brutos produzidos por *Trichoderma sp.* para sacarificação da celulose, sendo os coquetéis enzimáticos C014 (T2T + T02), C015 (T02 + T08), C016 (T2T + T08) e C017 (T02 + T2T + T08), sendo T2T, T02 e T08, os extratos obtidos do cultivo do *Trichoderma sp* em diferentes fontes

de carbono. Na avaliação das atividades enzimáticas os coquetéis formados C15 e C16 apresentaram as maiores atividades de Endoglucanase e FPase em comparação com os extratos. Todos os coquetéis apresentaram altos níveis de atividade de Celobiase e β -glicosidase.

Na sacarificação da AVICEL os coquetéis foram estatisticamente iguais aos extratos. Por outro lado, o coquetel C017 apresentou velocidade três vezes maior, comparado ao extrato de maior produção de glicose. A autora concluiu que houve uma complementação de enzimas nos coquetéis. Provavelmente, isso permitiu aumento do sinergismo enzimático, de forma a melhorar o desempenho durante a sacarificação da celulose (MAYRINK, 2010).

Narain *et al.* (2010) utilizaram diferentes misturas de extratos de fungos do gênero *Pleurotus* sp. para degradação de parede celular de plantas. Os autores, observaram que a hemicelulose apresentou os maiores níveis de degradação sendo influenciada pelos coquetéis. Houve significativa redução de 13,6% na hemicelulose, observada com o coquetel formado pelos extratos dos três fungos *Pleurotus* sp.. Os coquetéis formados pelas combinações de extratos de dois fungos reduziram significativamente os teores de hemicelulose e celulose. O coquetel formado pelos extratos de três fungos foi o mais efetivo na degradação entre todos os outros extratos utilizados.

A obtenção de preparados com alta atividade celulolítica depende do micro-organismo utilizado e do processo de produção das enzimas. O formulado celulolítico ideal pode ser obtido pelo co-cultivo de linhagens superprodutoras dos principais tipos de celulases (WEN *et al.*, 2005) ou pela produção isolada das celulases e posterior mistura dos extratos purificados, em proporções pré-otimizadas (LI *et al.*, 2005).

5.5 - CONCLUSÃO

Houve aumento na atividade de FPase para os coquetéis formados pelos complexos multi-celulases (extratos) dos cinco fungos juntos, em comparação com os extratos de cada fungo isoladamente.

Através do DCCR, foi possível obter um modelo quadrático significativo para explicar as variações nas atividades em decorrência dos diferentes níveis das variáveis utilizadas.

Nos níveis testados não houve interação significativa entre os coquetéis enzimáticos testados, mas com o efeito aditivo quadrático foi possível determinar níveis de máxima FPase.

No processo de otimização foi possível estabelecer os níveis de máxima atividade de FPase e também gerar os gráficos de superfície de resposta para visualizar o comportamento entre dois extratos fúngicos e a atividade de Celulase total. A partir das superfícies de resposta do gráfico chegou há uma formulação adequada ao coquetel mínimo de extratos.

Assim, foi possível dimensionar um coquetel mínimo de enzimas (extratos) para a máxima atividade de Celulase total, com 100,00 µL PYC02; 100,00 µL PC; 100,00 µL PLO06; 100,00 µL PLE04 e 200 µL TRAM01.

6 - CONCLUSÕES FINAIS E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

O sorgo forrageiro BRS 655 apresenta-se como alternativa para produção de etanol de segunda geração, principalmente pelo baixo teor de lignina. O pré-tratamento básico da palha do sorgo BRS 655 com 5% de NaOH, 1:15(biomassa:solução alcalina), por 15 minutos a 120 °C, é suficiente para proporcionar alta digestibilidade enzimática. Nos próximos trabalhos deve se avaliar também o bagaço do sorgo sacarino, material de grande potencial para o etanol 2G, quanto as suas características em relação a composição ligninocelulósicas e os resultados na aplicação de pré-tratamentos e sacarificação enzimática.

A palha de sorgo pode ser utilizada como substrato para geração de celulasas por fungos da podridão branca em fermentação em estado sólido, no entanto, os níveis de atividades das enzimas foram abaixo dos obtidos por outros fungos, possivelmente por se trabalhar com substrato não otimizado para as condições de crescimento do fungo (pH, temperatura, umidade) e não enriquecido com nitrogênio e ou minerais, sendo imprescindível a realização de um trabalho de otimização da fermentação em estado sólido da palha do sorgo com esses fungos.

O fungo *Pycnoporus sanguineus* PYC02 produz uma β -glicosidase termoestável, a qual deve apresenta grande potencial biotecnológico. No futuro pode se trabalhar com esse fungo para a produção dessa enzima em grande escala para aplicações em sacarificação enzimática, ou utilizar de ferramentas da engenharia genética para clonar o gene responsável pela produção dessa enzima em bactérias, para maiores níveis de produção, até mesmo comercial.

Na sacarificação da palha e das polpas pré-tratadas, o destaque foi a polpa básica, com os maiores níveis de hidrólise para a maioria dos fungos, o que já havia sido conseguido na sacarificação por enzimas comerciais, o que justifica a realização de outros estudos desse pré-tratamento e sacarificação da palha de sorgo BRS 655.

O complexo multi-celulasas do fungo *P. chrysosporium* PC hidrolisou cerca de 50% e 35% de biomassa das polpas básica e ácida/deslignificada, respectivamente, após 72 h. de reação e com carga de 8 FPU/g de biomassa. Nas mesmas condições, a enzima comercial hidrolisou apenas 3% da polpa

ácida/deslignificada. A utilização do extrato obtido desse fungo por fermentação em estado sólido da palha deve ser concentrado a níveis elevados de FPU e testado na sacarificação de diversos materiais ligninocelulósicos.

Houve aumento na atividade de FPAse para os coquetéis formados pelos extratos dos cinco fungos juntos, em comparação com os extratos de cada fungo isoladamente. O coquetel mínimo de extratos de enzimas dos fungos da podridão branca para a máxima atividade de Celulase total foi de 100,00 µL de PYC02; PC; PLO06; PLE04 e 200 µL de TRAM01. O resultado dos coquetéis foi muito relevante, mostrando que há uma complementação enzimática nos extratos que deve ser mais estudada, e também deve se avaliar coquetéis de extratos concentrados para a sacarificação de biomassa.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDW, K. B.; GOKHALE, D. V., VARMA, A. J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulose and cylanen production. **Carbohydrate polymers**, v. 56, p 67-72, 2004.

ALMEIDA, M. N. Caracterização de celulasas e hemicelulasas dos fungos *Acremonium zeae* e *Acremonium* sp. 2009. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda.V. 03. 2001.

BASTOS, V.D.. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. Alcoolquímica. 2007. 38p.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KURABI, A.; BURA, R.; TU, M.; KILBURN, D.; SADDLER, J. Weak ligninbinding enzymes - a novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121, p163–170, 2005.

BIRSAN, C.; JOHNSON, P.; JOSHI, M.; MACLEOD, A.; MCINTOSH, L.; MONEM, V.; NITZ, M.; ROSE, D.; TULL, D.; WAKARCHUCK, W.; WANG, Q.; WARREN, R.; WHITE, A.; WITHERS, S. Mechanisms of cellulases and xylanases. **Biochem Soc Trans**, v. 26, p.156–160, 1998.

BISARIA, R.; MADAN, M.; VASUDEVAN, P. Utilisation of agroresidues as animal feed through bioconversion. **Bioresource Technology**, v. 59, n.1, p.58, 1997.

BOTELHO FILHO, F. B. Centro de Estudos Avançados Multidisciplinares, Núcleo de Estudos Agrários. **Cadernos do Ceam/Energia e Biomassa**, Universidade de Brasília, Brasília, v. 8, n.33, 2008. 316 p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem.**, v.72, p. 248–254, 1976.

BRÁS, A. M.; MIRANDA, F.; HIPÓLITO, L.; DIAS, L. S. “O Minho a terra e o homem - Biomassa e produção de energia”, v. 51, p. 23-30, 2006. Disponível em: <http://portal.ipvc.pt/images/ipvc/esa/pdf/biomassa.pdf> Acesso em 20/03/2010.

BUKHTOJAROV, F. E.; USTINOV, B. B.; SALANOVICH, T. N.; ANTONOV, A. I.; GUSAKOV, A. V.; OKUNEV, O. N.; SINITSYN, A. P. Cellulase complex of the fungus *Chrysosporium lucknowense*: isolation and characterization of endoglucanases and cellobiohydrolases. **Biochemistry** (Moscow), v. 69, p.542-551, 2004.

BUSTO, M. D.; ORTEGA, N. M.; PEREZ-MATEOS, M. Location, kinetics and stability of cellulases induced in *Trichoderma Reesei* cultures **Bioresource Technology**, v. 57, p. 187-192, 1996.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T.; PERBERDY, J. F.; FU, S. Y.; YU, H. S. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, p.537-542. 1996.

CASTELLANOS, O. F., SINTITSYN, A. P., VLASENKO, E. Yu. Comparative Evaluations of hydrolytic toward Microcrystalline Cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma* Celulases. **Bioresouce Technology**, v. 52, p. 119-124, 1995.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CASTRO, M. A.; PEREIRA Jr. N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CARDOSO, W. S.; SANTOS, F. A.; MOTA, C. M.; TARDIN, F. D.; RESENDE, S. T.; QUEIROZ, J. H. Pré-tratamentos de biomassa para produção de etanol de segunda geração. **Revista Analytica**, Dezembro 2011/Janeiro 2012, n. 56, p. 64-76, 2012.

CGEE. “Estudo sobre as possibilidades e impactos da produção de grandes quantidades de etanol visando à substituição parcial de gasolina no mundo”. Relatório final, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos **CGEE-Nipe/Unicamp**, dezembro de 2005.

CLIFTON-BROWN JC, LEWANDOWSKI I, ANDERSSON B, BASCH G, CHRISTIAN DG, KJELDSSEN JB, JØRGENSEN U, MORTENSEN JV, RICHE AB, SCHWARZ K, TAYEBI K, TEIXEIRA F. Performance of 15 *Miscanthus* Genotypes at Five Sites in Europe. **AGRONOMY JOURNAL**, VOL. 93, SEPTEMBER–OCTOBER 2001, **Agron. J.**, v. 93, p. 1013–1019, 2001.

CORREDOR D.Y., SALAZAR J.M., HOHN KL, BEAN S, BEAN B, WANG D. Evaluation and characterization of forage sorghum as feedstock for fermentable sugar production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, p.164–179, 2009. doi:10.1007/s12010-008-8340-y.

DAMASCENO, C. M. B.; PARRELLA, R. A. C.; SIMEONE, M. L. P.; SCHAFFERT R. E.; MAGALHÃES J.V. Caracterização bioquímica de genótipos de sorgo quanto ao teor de lignina e análise molecular de rotas metabólicas visando à produção de etanol de segunda geração XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. CD-Rom. p.25 - 33. 2010.

DAMASCENO, C. M. B.; SOUSA, S. M.; NODA, R. W.; PARRELLA, R. A. C.; SCHAFFERT, R. E.; MAGALHÃES, J. V. Importância da Lignina para a Produção de Etanol de Segunda Geração. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas, MG. 2010. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/884400/1/doc108.pdf>. Acesso em 20/10/2011.

DIEN, B. S.; SARATH, G.; PEDERSEN, J. F.; SATTLER S. E.; CHEN H.; FUNNELL-HARRIS, D. L.; NICHOLS, N. N.; COTTA, M. A. Improved sugar conversion and ethanol yield for forage sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) lines with reduced lignin contents. **Bioenergy Research**, v. 2, p. 153-164, 2009.

DOGARIS, I.; VAKONTIOS, G.; KALOGERIS, E.; MAMMA, D.; KEKOS, D. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. **Industrial crops and products**, v. 2, n. 9, p. 404–411, 2009.

DRAETTA, I. S.; LOBO FILHO, M. Celulases de basidiomicetos: purificação e caracterização. **Coletânea do ITAL**, v. 11 p. 163-184, 1980.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste celluloses to fuel ethanol: A review. **Bioresource Technolqy**, v. 55: 1-33, 1996.

DURAN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFRED L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31: p. 907–931-2002.

DUTTA, T.; SAHOO, R.; SENGUPTA, R.; RAY, S. S.; BHATTACHARJEE A.; GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p. 275–282, 2008.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. Effect of grow substrate, method of fermentation and nitrogen source on lignocelluloses-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, n. 11, p. 1531-1538, 2008.

EGGERT, C.; TEMP, U.; DEAN, J. F. D.; ERIKSSON, K. E. L. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **FEBS Letters**, v. 391, p.144-148, 1996.

ESPOSITO, E.; INNOCENTINI-MEI, L. H.; FERRAZ, A.; CANHOS, V.P.; DURAN, N. Phenoloxidases and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (EUC-2050 strain): Applications. **Journal of Biotechnology**, v. 20, p.219-228, 1993.

FERNANDES, M. L. M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. 2007. 131p. **Tese de doutorado**. Curitiba. Paraná.

FOX, D. J.; GRAY, P. P.; DUNN, N. W.; WARWICK, L. M. Comparison of alkali and steam (acid) pretreatments of lignocellulosic materials to increase enzymic susceptibility: Evaluation under optimized pretreatment conditions. **J. Chem. Tech. Biotech.** v. 44, p.135-146, 1989.

GAO, J., WENG, H. ZHU, D., YUAN, M., GUAN, F. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7623–7629, 2008.

GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **Holz Als Roh-und Werkst**, v. 57, p. 191-202, 1999.

GUARDABASSI, P. M. Sustentabilidade da biomassa como fonte de energia perspectivas para países em desenvolvimento. 2006. 123 p. **Dissertação** (Mestrado – Programa Interunidades de Pós-Graduação em Energia) – EP / FEA / IEE / IF da Universidade de São Paulo,

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure Appl Chem.**, v. 59, p. 257-268, 1986.

GOYAL, A.; GHOSH, B.; EVELEIGH, D. Characteristics of fungal cellulases. **Bioresource Technology**, v. 36, p. 37-50, 1991.

HALL, C. W. Energy Sources and Conversions Relating Foods. In: **Food and Energy Resources**, Edited by PIMENTEL, D. & HALL, C. W, London: Academy Press, INC., p. 25- 42, 1984.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio- ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends Biotechnol.**, v. 24, n.12, p.549–556, 2006.

HATAKKA, A. I. Pretreatment of wheat straw by white rot fungi for enzymic saccharification of cellulose. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p. 350-357, 1983.

IANDOLO, D.; PISCITELLI, A.; SANNIA, G.; FARACO, V. Enzyme Production by Solid Substrate Fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on Tomato Pomace. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 163, p.40–51, 2011.

JAN, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.19, p. 263-268, 2003.

KAKOSOVA, A. B.; DIGONNET, C.; GOUBET, F.; RANOCHA, P.; JAUNEAU, A.; PESQUET, E.; BARBIER, O.; ZHANG, Z.; CAPEK, P.; DUPREE, P.; LSKOVA, D.; GOFFNER, D. Galactoglucomannans Increase Cell Population Density and Alter the Protoxylem/Metaxylem Tracheary Element Ratio in Xylogenic Cultures of Zinnia. **Plant Physiology**, v.142, p. 696–709, 2006.

KARP, A.; SHIELD, I. Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. **New Phytologist**, v. 179, p.15–32, 2008. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02432.x.

KASSIM, E. A.; EL-SHAHED, A. S. Enzymatic and chemical hydrolysis of certain cellulosic materials. **Agr. Wastes**, v.17, p. 229-233, 1986.

KHALIL, A. I. Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, n. 8, p.753-759, 2002.

KIM, K. H.; HONG, J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technol.**, v. 77, p. 139-144, 2001.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. L. J. E.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Ind. Eng. Chem. Research**, Article ASAP Publication Date (Web): 20 March 2009.

LAP 001 - Laboratory Analytical Procedure Standard Method for Determination of Total Solids in Biomass. (The National Renewable Energy Laboratory (NREL) (http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html)).

LAP 005 - Laboratory Analytical Procedure Standard Method for Ash in Biomass. (The National Renewable Energy Laboratory (NREL) (http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html)).

LAP 008 - Laboratory Analytical Procedure SSF Experimental Protocols: Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation. (The National Renewable Energy Laboratory (NREL) (http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html)).

LECHNER, B. E.; PAPINUTTI, V. L. Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. **Process Biochemistry**, v.41, p.594–599, 2006.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v.56, p.1–24, 1997.

LEE, K. M.; JEYA, M.; JOO, A.; SINGH, R.; KIM, I.; LEE, J. Purification and characterization of a thermostable endo- β -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p. 206-211, 2010.

LEMUS, R.; PARRISH, D. J. Herbaceous crops with potential for biofuel production in the USA. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 4, n.057, 2009.

LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS, M. W.; CHO, N. S.; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. REVIEW Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p.175–185, 1999.

LI, X.-L.; DIEN, B.S.; COTTA, M.A.; WU, Y.V.; SAHA, B.C. Profile of enzyme production by *Trichoderma reesei* grown on corn fiber fractions. **Applied Biochemistry and Biotechnology** - Part A, v. 121, p. 321-334, 2005.

LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. Cellulase activity produced by *Streptomyces drozdowiczii* using low cost agri-industrial by-products and tests for biotechnological application. **Enz. Microbial Technol.**, v. 37, p. 272-277, 2005.

LYND, L. R., et al. Fuel ethanol from cellulosic biomass. **Science**, v. 251, n. 4999, p. 1318-1323. 1991.

LIPINSKY, E.S.; KRESOVICH, S. Sorghums as energy sources. Proc. Bio-Energy'80 World Congress and Exposition, Atlanta, GA. 21–24 Apr. 1980. **The Bio-Energy Council**, Washington, D.C. 91–93, 1980.

LORA, E. E. S.; CORAL, D. D. S. O.; ROCHA, M. H. Plataformas termoquímica e bioquímica para uso da biomassa, concepção; Rendimentos e Economia, p. 1-18, 2008.

MACHADO, F. S. Avaliação agronômica e nutricional de três híbridos de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] e de suas silagens em três estádios de maturação. 2009. 109 p. **Dissertação** (Mestrado em zootecnia). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte.

MADAMWAR, D.; PATEL, S. Formation of cellulases by co-culturing of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on cellulosic waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.8, p. 183-186, 1992.

MANSUR, *et al.* The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. **Mycologia**, v. 95, p. 1013-1020, 2003.

MAYRINK, M. I. C. B. Produção de enzimas fúngicas e avaliação do potencial das celulasas na sacarificação da celulose. 2010. 94 p. **Tese de**

doutorado apresentada à Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais – Brasil

MCLAUGHLIN, S. B.; KSZOS, L. A. Development of switchgrass (*panicum virgatum*) as a bioenergy feedstock in the United States. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 515-535, 2005.

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production; Himmel, M. E., Baker, J. O., Overend, R. P., Eds.; **American Chemical Society**: Washington, DC, p. 292-324, 1994.

MEDVE, J. Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II. 1997, 49 p. **PhD Thesis**, Department of Biochemistry, Lund University, Lund, Sweden.

MEYER, A. S.; ROSGAARD L.; SORENSEN H. R..The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing **Journal of Cereal Science**. Journal of Cereal Science xxx, 1–8, 2009.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426–428, 1956.

MONTI, A.; VENTUR, G. Comparison of the energy performance of fibre sorghum, sweet sorghum and wheat monocultures in northern Italy. **European Journal of Agronomy**, v.19, p. 35–43, 2003.

MOONEY, C. A.; MANSFIELD, S. D.; TOUHY, M. G.; SADDLER, J. N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. **Bioresource Technol.**, v. 64, p. 113-119, 1998.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 68, p. 61- 138, 2000.

NEUMANN, M.; RESTLE, J.; ALVES FILHO, D. C.; BRONDANI, I. L.; MENEZES, L. F. G. Resposta econômica da terminação de novilhos em confinamento, alimentados com silagem de diferentes híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor*, L. Moench). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 849-854, 2002.

NARAIAN, R.; SINGH, D.; VERMA, A.; GARG, S. K. Studies on in vitro degradability of mixed crude enzyme extracts produced from *Pleurotus* spp. **Journal of Environmental Biology**, v. 31, n. 6, p. 945-951, 2010.

NG, I. S.; LI, C. W.; CHAN, S. P.; CHIR, J. L.; CHEN, P. T.; TONG, C. T.; YU, S. M.; HO, T. H. D. High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1310-1317, 2010.

- NIGAM, P.; SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. **J. Basic Microbiology**, v. 6, p. 405-423, 1994.
- OLIVEIRA, F. M. V. Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana. 2010. 98 p. Dissertação mestrado Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena – SP.
- PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *T. reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on team pretreated softwood and isolated lignin. **J. of Biotechnology**, v. 107, p. 65-72, 2004.
- PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v.18, p. 37-45, 2003.
- POINTING, S. B.; VRIJMOED, L. L. P. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoxidase. Short communication. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 317-318, 2000.
- RAMIREZ, R. Q. Hidrólise da biomassa lignocelulósica. In: CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de cana-de-açúcar**. P&D para produtividade e sustentabilidade. UNICAMP: Blucker, p. 717-731, 2010.
- REDDY, G. V.; RAVINDRA, P. B.; KOMARAIAH, P.; ROY, K. R. R. M.; KOTHARI, I. L.. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1457-1462, 2003.
- RODRIGUES, J. A. S.; SANTOS, F. G.; SHAFFERT, R. E.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C.R.; TARDIN, F. D. BRS 655 - Híbrido de sorgo forrageiro para produção de silagem de alta qualidade. **Circular técnica** 107. ISSN 1518-4269. Sete Lagoas, MG. Dezembro, 2008. 2p.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. Campinas, SP: Editora Casa do Pao, 2005.
- RODRIGUES, R. S. Produção de enzimas e avaliação do pré-tratamento ácido de biomassas para produção de bioetanol. 2009. 95 p. **Dissertação** apresentada a Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais – Brasil.
- SANTOS, E. A.; SILVA, D. S.; FILHO, J. L. Q. Composição Química do Capim-Elefante cv. Roxo Cortado em Diferentes Alturas. **Revista brasileira de zootecnia**, v. 30, n. 1, p. 18-23, 2001.

SANTOS F. A., QUEIRÓZ J. H., COLODETTE J. L., FERNANDES S. A., M. G. V., REZENDE S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química. Nova**, Vol. xx, N. xx, 1-7, 2012.

SAWAZAKI, E. Sorgo forrageiro ou misto, sorgo granífero, sorgo vassoura – *Sorghum bicolor* L. Moench. In: FALH, J.L.(Ed.) **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. 6 ed. Campinas, IAC, p.44-49, 1998.

SCHREMPF, H.; WALTER, S. The cellulolytic system of *Streptomyces reticuli*. **Inter. J. of Biological Macromolecules**, v.17, p.353-355, 1995.

SCHULEIN, M. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 71-81, 1997.

SILVA, E. R. Biodegradação fúngica de resíduos agroindustriais para a produção de biomassa microbiana, enzimas ligninocelulolíticas e redução de fitatos. UNICAMP. Campinas, SP:[s.n], 2001

SILVA J, C., GOUVEIA E. R. Algumas propriedades de endoglucanases produzidas por *Streptomyces spp.* em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. **Rev. bras. de tecnologia Agroindustrial**, v. 2, n. 2: p. 60-70, 2008.

SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E.. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 36, n. 3, 2005.

SILVA, V.F.N. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. 2009. 116 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP.

SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTE, M. D.; OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technol.**, v. 98, p. 3000-3011, 2007.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Improved cellulose production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, p.60-70, 2007.

SIQUEIRA, F. G. Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases. 2010, 277 p. **Tese de doutorado**. Brasília-DF.

SINGH, *et al.* Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: Comparison with commercial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6679–6681. 2009.

- SMITH, C.W.; FREDERIKSEN, R. A. Sorghum: Origin, history, technology, and production. **John Wiley and Sons**, New York. 2000.
- SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. O Setor Sucroalcooleiro e o Domínio tecnológico. **NAIPPE**, São Paulo, SP, p. 3 – 21. 01 jun. 2007.
- SONIA, K. G., CHADHA B. S., SAINI H. S. Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid-state fermentation **Bioresource Technology**, v. 96, n. 14, September, p. 1561–1569, 2005.
- SOTO, M. L.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; LEMA, J. M. Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls. **Bioresour. Technol.**, v. 49, p. 53-59, 1994.
- SUN, Y; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1–11, 2002.
- TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. **BioResources**, v. 2, p. 707-738, 2007.
- TAHERZADEH M. J.; KARIMI K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review **Int. J. Mol. Sci.**, v.9, p. 1621-1651, 2008.
- TECHNOLOGY REVIEW. “Redesigning life to make ethanol”. Technology Review - an MIT Enterprise. Disponível em: <http://www.technologyreview.com/printer_friendly_article.aspx?id=17052>. Acesso em: 9/10/2009.
- TENGERDY, R. P. Solid substrate fermentation for enzyme production. In: PANDEY, A. (Ed.) **Advances in Biotechnology**. New Delhi: Educational Publishers & Distributors, p.13-16, 1998.
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann Clin Biochem.**, v. 6, p. 24-27, 1969.
- THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiol.**, v. 140, p. 19-26, 1994.
- UFV, 2007. SAEG. Sistema para análises estatísticas Versão 9.1. Viçosa-MG
- VALASKOVA, V.; BALDRIAN, P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. **Res Microbiol.**, v. 157, p. 119–124, 2006.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J. of Animal Science**, v.74, n.10, p.3583- 3597, 1991.

- VERMERRIS, W.; SABALLOS, A.; EJETA, G.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R.; CARPITA, N. C. Molecular breeding to enhance ethanol production from corn and sorghum stover. **Crop Science**, Madison, v. 47, S142-S153, 2007. Suplemento
- VIKINESWARY, S.; ABDULLAH, N.; RENUVATHANI, M.; SEKARAN, M.; PANDEY, A.; JONES, E.B.G. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. **Biores. Technol.**, v. 97, p. 171–177, 2006.
- WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 491-499, 2004.
- WOODARD, K. R.; PRINE, G.M. Dry matter accumulation of elephantgrass, energycane, and elephantmillet in a subtroPYCal climate. **Crop science**, vol. 33, n. 4, p. 818-824, 1993.
- WOOD, T. M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. Biodegradation, Netherlands, v.1, n. 2/3, p. 147-167, 1990.
- WYMAN, C.E. Handbook on bioethanol: production and utilization; Taylor & Francis: Washington DC, USA, 1996.
- XIMENES, E.A.; FELIX, C.R.; ULHOA, C.J. Production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* and Characterization of One β -Glucosidase. **Current Microbiology**, v. 32, p. 119-123, 1996.
- YAT, S.C.; BERGER, A.; SHONNARD, D.R. Kinetic characterization of dilute surface acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 3855-3863, 2008.
- ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Comparative study on chemical pretreatment methods for improving enzymatic digestibility of crofton weed stem. **Bioresource Technol.**, v. 99, p. 3729-3736, 2007.
- ZHENG, Y.; PAN Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **Int J Agric & Biol Eng.**, v. 2, n. 3, p. 51-68, 2009.
- ZHUANG, J.; MARCHANT, M. A.; NOKES, H.J.; STROBEL, H. J. Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol. **Applied Engineering in Agriculture**, v.23, n. 5, p. 679-687, 2007.
- ZÚÑIGA, U. F. R. Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração. 2010. 228p. **Tese de Doutorado**. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.